

Einfluss unterschiedlicher Volumenersatzlösungen auf
Apoptose und Inflammation der Niere
– eine immunhistologische und molekularbiologische
Untersuchung am septischen Schwein –

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Sylvia Krause
geboren am 31.01.1983 in Jena

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Marx, Aachen
2. Prof. Dr. F. Eckoldt, Jena
3. Prof. Dr. K. Amann, Erlangen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.04.2011

Für meine Großeltern

**„Es ist nicht genug zu wissen,
man muss es auch anwenden.
Es ist nicht genug zu wollen,
man muss es auch tun.“**

(J. W. Goethe)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANV	akutes Nierenversagen(-s)
Aqua dest.	(dreifach) destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CASP	Caspase(-n)
C/EBP-β	<i>CAAT/enhancer binding protein beta</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D	Deutschland
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GF	Gesichtsfeld
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HES	HAES, Hydroxyethylstärke, <i>Hydroxyethyl starch</i>
HZV	Herzzeitvolumen
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton (Masseinheit)
KG	Körpergewicht
μ	Mikro (10 ⁶)
MG	Molekulargewicht
MAP	mittlerer arterieller Druck
mM	Millimolar
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MW	mittleres Molekulargewicht (kDa)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
LPS	Lipopolysaccharid (bakterielles Endotoxin)
OD	optische Dichte
OT	Objekträger(-s)
P53	Protein 53
PBS	Phosphat gepufferte Salz-Lösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PHA-E	Lektin <i>Phaseolus vulgaris</i> erythroagglutinin
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten, <i>polymorphonuclear leukocytes</i>
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure, <i>Ribonucleic acid</i>
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> -Polymerase-Ketten-Reaktion
STABW	Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
TMA	thrombotische Mikroangiopathie
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TUNEL	<i>Terminal-Transferase-Uridin-Nick-End-Labeling</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEL	Volumenersatzlösung
x	-fach(-e)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	3
1.1	Sepsis und Septischer Schock.....	3
1.1.1	Pathophysiologie der Sepsis.....	5
1.1.2	Rolle der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten im „two-hit“- Modell.....	6
1.1.3	Apoptose als Pathomechanismus in der Sepsis	8
1.2	Aufbau und Funktion der Niere	10
1.2.1	Renale Pathophysiologie im hämorrhagischen Schock	12
1.2.2	Renale Pathophysiologie im septischen Schock.....	13
1.2.3	Akutes Nierenversagen.....	14
1.3	Grundprinzipien der verschiedenen Volumenersatzlösungen	16
1.3.1	Pathomechanismen Volumen induzierter Nierenfunktionsstörungen...20	
2	FRAGESTELLUNG	23
3	MATERIAL UND METHODEN.....	24
3.1	Tiermodell	24
3.1.1	Versuchstiere	24
3.1.2	Narkoseeinleitung	24
3.1.3	Sepsisinduktion und Versuchsablauf	25
3.2	Volumenersatztherapie und Gruppeneinteilung	27
3.3	Gewebeentnahme	27
3.4	Immunhistologische Arbeitsweisen	28
3.4.1	Gewebeaufbereitung.....	28
3.4.2	Entparaffinierung.....	28
3.4.3	Eingesetzte Färbetechniken	29
3.4.4	Morphometrische Auswertung der histologischen Präparate.....	33
3.5	Molekularbiologische Methode.....	35
3.5.1	RNA-Isolierung.....	35
3.5.2	Denaturierende elektrophoretische Trennung von RNA	36
3.5.3	cDNA-Synthese	37
3.5.4	Primerdesign.....	38
3.5.5	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	39
3.5.6	Molekularbiologische Auswertung.....	41

4	ERGEBNISSE	43
4.1	Immunhistologische Ergebnisse.....	43
4.1.1	HE-Färbung	43
4.1.2	Esterase-Färbung	44
4.1.3	TUNEL-Färbung.....	48
4.1.4	Jones-Färbung und Lektinbindung.....	52
4.1.5	MSB-Färbung.....	56
4.1.6	PAS-Färbung	58
4.2	Molekularbiologische Ergebnisse	60
5	DISKUSSION	62
5.1	Diskussion der Methoden.....	62
5.1.1	Versuchsaufbau	62
5.1.2	Immunhistologische Methoden	65
5.1.3	Molekularbiologische Methoden.....	66
5.2	Diskussion der Ergebnisse	68
5.2.1	Immunhistologische Ergebnisse	68
5.2.2	Molekularbiologische Ergebnisse.....	78
6	AUSBLICK	86
7	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	88
8	ANHANG	104
8.1	Immunhistologisch verwendete Lösungen und Reagenzien	104
8.2	Datenanhang.....	107
9	CURRICULUM VITAE	110
10	DANKSAGUNG	112
11	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	113

Die Sepsis stellt auch in der heutigen modernen Intensivmedizin mit Fortschritten im Bereich der supportiven und adjunktiven Therapie sowie auf dem Gebiet der Diagnostik noch immer ein Krankheitsbild mit hoher Letalität dar. Insbesondere auf zellulärpathologischer und molekularbiologischer Ebene bedarf es somit weiterer Untersuchungen, um die komplexen Mechanismen der überschießenden Wirtsreaktion zu entschlüsseln und eine Letalitätsreduktion zu erreichen.

Integraler Bestandteil der Leitlinien orientierten Therapie beinhaltet eine adäquate Volumensubstitution. Grundsätzlich stehen hierzu kristalloide und kolloidale Volumenersatzlösungen (VEL) zur Verfügung, wobei insbesondere Kolloide mit der Manifestation einer Nierenschädigung bzw. eines Nierenversagens assoziiert werden. Dieser Aspekt wird derzeit kontrovers diskutiert, ebenso wie der Einfluss der VEL auf die Nierenfunktion.

Bisher ist auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene unklar, warum eine Therapie mit Kristalloiden einer Behandlung mit kolloidalen VEL überlegen sein könnte. Ziel dieser Studie ist es, die Wirkungen verschiedener VEL auf die Niere sowie das organspezifische Zusammenspiel inflammatorischer und apoptotischer Prozesse nach Hämorrhagie und Sepsis zu charakterisieren. Dies sollte klinisch relevant im Groß-Tiermodell simuliert werden.

Hierfür wurden 28 juvenile, gesunde Schweine anästhesiert, operativ katheterisiert und hämodynamisch überwacht. Anschließend wurde ein hämorrhagischer Schock als „first-hit“ eingeleitet. Nach stabilisierter Kreislaufsituation wurde mittels intraperitonealer Implantation eines vitalen *Escherichia coli* Fibrin-Clots eine schwere Peritonitis als „second-hit“ ausgelöst. In den folgenden zwölf Stunden bis zur Organentnahme erhielten die Versuchstiere zur Kreislaufstabilisierung balancierte kristalloide Ringer-Azetat-Lösung (n=5) oder kolloidale Lösungen der Art 6% Hydroxyethylstärke (HES) 130/0,42 in Ringer-Azetat-Lösung (n=5), 10% HES 200/0,5 in isotonischer NaCl-Lösung (n=5) oder 4% Gelatine in Ringer-Azetat-Lösung (n=5). Zusätzlich wurde eine adäquate Sham-Gruppe untersucht. In Hinblick auf die jeweiligen Fragestellungen wurden neben weiteren histochemischen Färbemethoden die Esterase-Färbung zur Darstellung der Entzündung sowie die TUNEL-Färbung zur Apoptose-Darstellung eingesetzt. Zudem wurden sepsisrelevante Mediatoren in Hinblick auf apoptotisches und inflammatorisches Geschehen im Nierengewebe molekularbiologisch mittels qRT-PCR analysiert.

Als Folge des „two-hit“-Modells konnte bei allen septischen Versuchstieren akutes Nierenversagen mit Zeichen beginnender Nekrose des Tubulusepithels festgestellt werden. Als Hauptegebnis dieser Studie wiesen die mit 10% HES 200 therapierten Tiere, verglichen mit jenen Tieren, die 6% HES 130, 4% Gelatine oder Ringer-

Azetat-Lösung erhielten, eine signifikant höhere Nierenschädigung auf. Entzündliche Vorgänge spielten sich primär im Bereich der Glomeruli ab, während apoptotischer Zelltod mit geringerer Affinität und prädominant im Tubulointerstitiellen Bereich der Nieren auftrat. Die TUNEL-Färbung zeigte signifikant erhöhte Apoptoseraten bei den Therapien mit 10% HES 200 und 4% Gelatine im Vergleich zur Sham-Gruppe. Unterschiede zwischen den anderen untersuchten VEL erwiesen sich als nicht signifikant. Darüber hinaus konnten anhand Lektinbindung und Jones-Färbung unterschiedlich stark ausgeprägte Tubulusepithelschäden mit Bürstensaum-Destruktion und Rarefizierung aufgezeigt werden. Entgegen anderer wissenschaftlicher Arbeiten konnte das Auftreten einer Vakuolisierung von Tubulusepithelien mittels PAS-Färbung interessanterweise nicht lediglich durch HES-Lösungen induziert werden. Diese sogenannte osmotische Nephrose wurde somit als ein relevanter Pathomechanismus der Sepsis bewertet.

Im Rahmen einer Genexpressionsanalyse zeigte sich infolge HES-Applikation ein inverser Zusammenhang zwischen sepsisrelevanten Mediatoren und der Reaktion im Gewebe. Entgegen der erwarteten Induktion aller ausgewählten inflammatorischen und apoptotischen Gene wurde unter den beiden HES-Lösungen eine moderate Regulierung dieser Mediatoren nachgewiesen. Dies spricht für ein ungeklärtes Signaltransduktionsnetzwerk auf dem Weg zum Protein und wurde als interessanter Ansatz zum besseren Verständnis für nachfolgende Untersuchungen bewertet.

Anhand der vorliegenden tierexperimentellen Untersuchung ist erstmals mittels „first-hit“ induzierter Änderung der Pathophysiologie ein Zusammenhang inflammatorischen und apoptotischen Geschehens im septischen Nierenversagen offenbar geworden. Hyperonkotisches 10% HES 200 trägt bei Sepsis bedingtem Nierenversagen signifikant zur Irreversibilität des Geschehens bei und auch unter Gelatine-Therapie stellten sich zusätzliche Schädigungen dar. Demgegenüber scheint isoonkotisches 6% HES 130 als Volumenersatz weniger nachteilig und in etwa vergleichbar mit dem Schädigungsmuster nach Therapie mit kristalloider Ringer-Azetat-Lösung zu sein. Offensichtlich ist Kolloid nicht gleich Kolloid.

1 EINLEITUNG

1.1 Sepsis und Septischer Schock

Im Zeitalter moderner Medizin stellt die Sepsis trotz gut entwickelter therapeutischer Strategien nach wie vor eine der Haupttodesursachen dar (Sasse et al. 1995, Gopal et al. 1997) und rangiert noch vor Erkrankungen wie Brustkrebs oder AIDS (Angus und Wax 2001). Aktuelle Daten belegen, dass in Deutschland jedes Jahr 154.000 Menschen an Sepsis erkranken (Brunkhorst 2006), wobei die Krankenhausletalität mit rund 54% inakzeptabel hoch ist (Grimminger et al. 1997, Brunkhorst 2006). Initial sterben 30% aller Patienten innerhalb der ersten drei Tage und 80% innerhalb der ersten beiden Wochen (Brun-Buisson et al. 1995). Sepsis ist die aggressivste Form der Wirtsreaktion auf eine Infektion, die durch Noxen viraler, fungaler oder parasitärer Mikroorganismen, am häufigsten jedoch durch bakterielle Toxine hervorgerufen wird (Annane et al. 2005, Brabant et al. 2007). Der Verlauf einer Sepsis ist in der Mehrzahl der Fälle dadurch charakterisiert, dass sich zunächst aus einer lokalisierten und kontrollierten Abwehrreaktion eine überschießende und unkontrollierte Reaktion im Zusammenwirken von generalisierter Inflammation (SIRS), Antiinflammation, Koagulation und Fibrinolyse entwickelt. Innerhalb weniger Stunden können zwei oder mehr vitale Organsysteme gleichzeitig oder in rascher zeitlicher Abfolge ausfallen. Das Multiorgan dysfunktionssyndrom (MODS) geht als initiale Organinsuffizienz dem Multiorganversagen (MOV) voraus (Zeni et al. 1997). Die Diagnosekriterien für schwere Sepsis und septischen Schock wurden 1992 in einer Konsensuskonferenz der Society of Critical Care Medicine (SCCM) festgelegt (Bloos et al. 2008) und erfordern den Nachweis einer Trias, bestehend aus Infektion, SIRS und Organdysfunktion. Trotz adäquater Volumentherapie zeigt sich dabei eine refraktäre Hypotension (Bone et al. 1992, Levy et al. 2003). Ein vereinfachtes Schema diesbezüglich stellt Abb. 1 dar. Zudem wurden die Konsensuskriterien für eine bessere klinische Anwendbarkeit mit einem Kriterienkatalog versehen (Gramm 1995, Bloos et al. 2008).

Klinisches Bild: Klinisch stehen aufgrund der endogenen Pyrogenfreisetzung eine gestörte Thermoregulation sowie Schocksymptomatik mit Tachykardie, Hypotonie und Tachypnoe (Annane et al. 2005) im Vordergrund. Im Verlauf der Erkrankung kann es zu lebensgefährlichen Funktionsstörungen der Nieren, Le-

ber und des Gastrointestinaltraktes kommen. Sowohl Ursache als auch Folge einer Sepsis können pulmonale Manifestationen, wie das akute Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS) sein. Neben Veränderungen des Blutbildes und des Gerinnungsstatus` fallen laborchemisch metabolische Störungen wie Hyperglykämie, Hyperlaktatämie, Hyperurikämie und Hypophosphatämie auf.

Diagnostik: Neben dem mikrobiologischen Nachweis eines Erregers im Blut, was bisher die *conditio sine qua non* der Sepsisdiagnose darstellte, wurde nach modernem Verständnis die Diagnostik um Überwachung physiologischer Parameter und durch den Nachweis bestimmter endogener Substanzen wie dem Prohormon Procalcitonin (PCT) oder dem Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) ergänzt (Brunkhorst et al. 2002, Guven et al. 2002). Deutlich sensibler als der Nachweis mittels Blutkultur ist die PCR-Technologie, wie z.B. durch den LightCycler® SeptiFast Test (Lodes 2008, Bloos et al. 2010), wobei weitere klinische Testungen noch zur Beurteilung nötig sind.

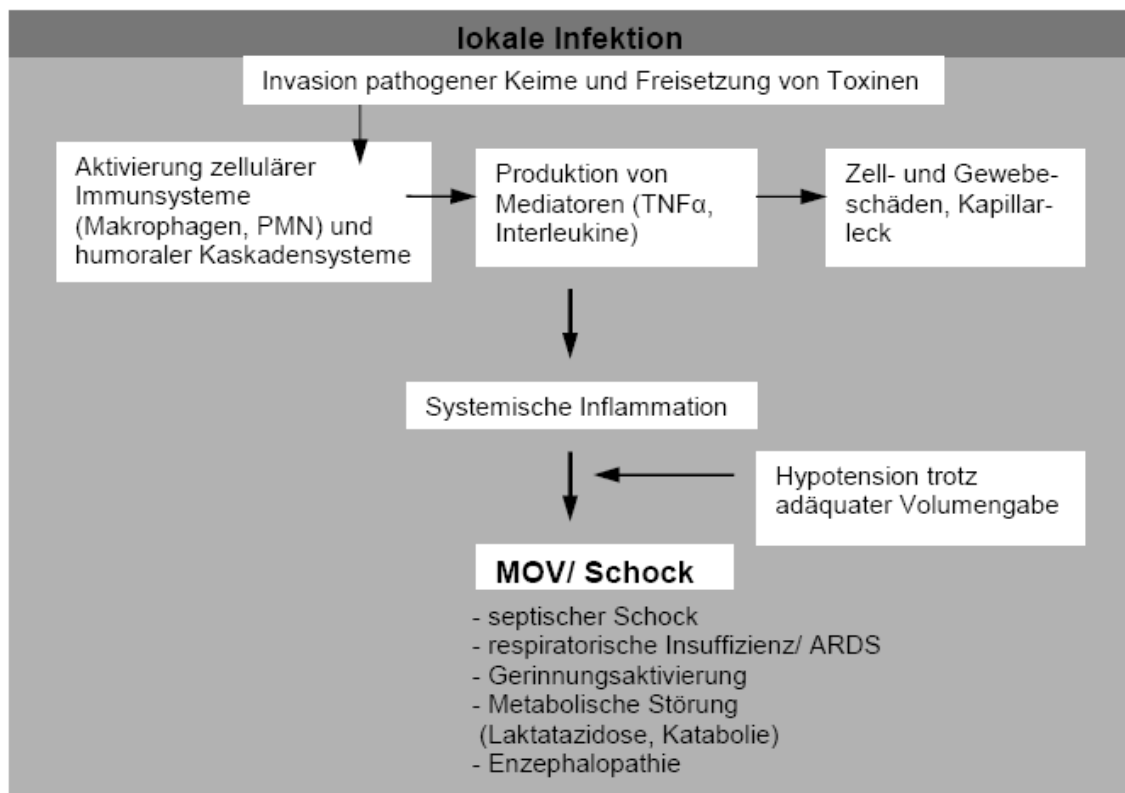


Abb. 1 Vereinfachtes Schema zur Pathophysiologie der Sepsis (modifiziert nach Bloos et al. 2008). Die primären Mediatoren induzieren durch Freisetzung verschiedener sekundärer Mediatoren eine signalverstärkende Wirkung.

1.1.1 Pathophysiologie der Sepsis

Das Zusammenwirken von Infektion und Immunantwort spielt im Rahmen der Sepsis eine entscheidende Rolle. Das angeborene Immunsystem reagiert auf molekular Pathogen assoziierte Muster (PAMP) mit der Ausschüttung von Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, IL1 und IL6 (Fearon und Locksley 1996), um Phagozyten und Lymphozyten zum Ort der Infektion zu locken. Diese primäre Immunantwort wird durch das Freisetzen einer Vielzahl, ebenfalls pleiotrop wirksamer, sekundärer Mediatoren (Plättchen aktivierender Faktor, Eicosanoide) weiter verstärkt. Solch übermäßige Produktion proinflammatorischer Zytokine ist zuweilen gefährlicher als der ursprüngliche Reiz und führt über sogenannte Kapillarlecks und Gewebeschädigung zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) (Slofstra et al. 2007). Zusätzlich kommt es zu einer systemischen Aktivierung der Blutgerinnung bis hin zur intravaskulären Fibrinbildung (ten Cate et al. 1999), was wiederum zur Bildung disseminierter Mikrothromben in der Endstrombahn führt und die Organperfusion zusätzlich beeinträchtigt. Trotz weiterer Kenntnisse über die Pathogenese der DIC bleiben die genauen molekularen Mechanismen schwer fassbar (Levi et al. 1999).

Die Gerinnungskaskade ist über das Endothel eng mit der inflammatorischen Reaktion vernetzt (Rüter 2004). Die Gesamtzahl der Endothelzellen ist, wie in Tab. 1 aufgezeigt, als ein gerinnungs-, kreislauf- und immunologisch aktives Organ aufzufassen (Schwarzacher 2002). Gleichzeitig sind die Endothelzellen an der Initiierung und der Aufrechterhaltung des septischen Geschehens beteiligt (Sablotzki 2001).

Tab. 1 **Aufgaben des Endothels**

Immunologische Funktion	Gerinnungsaktivierende Funktion	Kreislaufaktivierende Funktion
Extravasation von Granulozyten	Aktivierung von Thrombozyten	NO-Produktion
Extravasation von Monozyten	Thromboxan A ₂ -Produktion	Angiotensin II-Produktion
Expression von Adhäsionsmolekülen	Expression von vWF	
Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden		

vWF = von Willbrand-Faktor, NO = Stickstoffmonoxid

Neben der Hyperinflammation kommt es ebenso zu einer antiinflammatorischen Reaktion durch Bildung und Freisetzung antiinflammatorischer Substanzen (z.B. lösliche TNF-Rezeptoren, IL1-Rezeptorantagonisten, IL4, IL10). All diesen zir-

kulierenden Mediatoren wird eine große Bedeutung in der Induktion sekundärer Organläsionen zugeschrieben (Bone et al. 1997). So ist eine Persistenz antiinflammatorischer Mediatoren möglicherweise mit einer ungünstigen Prognose des Patienten assoziiert. Unklar ist, in welcher Weise die Stadien der Hypo- und Hyperinflammation aufeinander folgen und welche Auswirkungen das Zusammenspiel auf den Krankheitsverlauf hat (Hotchkiss und Karl 2003). Ergänzend hierzu spielt der Prozess des programmierten Zelltodes (Apoptose) immunkompetenter Zellen in der Sepsis eine Rolle. So wurde die Apoptose von Leukozyten, Lymphozyten und parenchymatösen Zellen sowohl im Tiermodell als auch am Patienten beobachtet (Hotchkiss et al. 1997, Weber et al. 2004). Durch Induktion der Apoptose von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems ergibt sich eine immunsuppressive Wirkung, was im Rahmen einer Sepsis nicht zu einem Überlebensvorteil führt (Hotchkiss und Nicholson 2006). Als Ursache wird dabei eine weit verbreitete Immunparalyse infolge der systemischen Entzündungsreaktion diskutiert (Hotchkiss et al. 1997).

Deutlich wird, dass polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) nicht einfach nur Effektorzellen des Immunsystems sind, sondern dass sie durch ihre Fähigkeit der Zytokinproduktion in die Immunregulation eingreifen und dadurch direkt mit anderen Entzündungszellen kommunizieren (Fujishima und Aikawa 1995).

1.1.2 Rolle der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten im „two-hit“-Modell

Neutrophile Granulozyten übernehmen als professionelle Phagozyten im menschlichen Körper eine wichtige Abwehrfunktion gegen eingedrungene Mikroorganismen (Wagner und Roth 1999). Dazu werden sie mittels regulierter Signalkaskaden und Mediatorsysteme aktiviert. Angeregte PMN können jedoch auch an der Entwicklung von Organschädigungen im Rahmen des Organversagens bei SIRS beteiligt sein. Eine genaue Abschätzung dieser konträren protektiven bzw. destruktiven Funktionen der PMN gelang jedoch bis *dato* nicht (Perl et al. 2007).

Der Vorgang der Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten aus dem Blut zum Infektionsherd erfolgt in mehreren Schritten (Migration) und wird durch das Konzentrationsgefälle bestimmter Zytokine (IL1, TNF α) vermittelt (Abb. 2), welche nach der Aufnahme von Mikroben durch Makrophagen ausgeschüttet wer-

den. Durch die Induktion von Chemokinen binden angelockte PMN über spezielle Rezeptoren am Gefäßendothel. Selektin vermittelt führt dies zu einem langsamen „entlangrollen“ der Makrophagen und PMN am Endothel (Speckmann et al. 2008). Weitere Liganden wie z.B. VCAM-1 und ICAM-1, werden an deren Oberfläche gebunden, was die sogenannte Leukozytenadhäsion vervollständigt (Mims 2006) und deren Festhaften an Kapillarwänden begünstigt (Margination). Die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an Endothelzellen stellt den initialen und limitierenden Schritt für die akute inflammatorische Antwort nach Ischämie bzw. Reperfusion dar (Guba et al. 2000). Um den Durchtritt der Phagozyten zwischen den endothelialen Zellen zum infizierten Gewebe zu gewährleisten, schütten neutrophile Granulozyten ihre spezifischen Granula aus, deren Proteasen die Auflösung der extrazellulären Endothelzell-Matrix ermöglichen. Durch die Freisetzung lysosomaler Enzyme (Degranulation) wird die nicht-oxidative Abtötung vermittelt, wohingegen die oxidative Zellzerstörung durch Sauerstoff-Metabolite erfolgt (McPhail und Harvath 1994). Die genauen Mechanismen der Neutrophilen-Degranulation sind bisher jedoch nicht hinreichend verstanden (Lacy und Eitzen 2008).

Ferner haben PMN die Fähigkeit, Bakterien mittels einer freigesetzten fibrillären Matrix aus Granula-Proteinen und Chromatin zu binden. Dies verhindert zum einen die weitere Verbreitung von Bakterien und fördert zum anderen das Zerstören der dort festgesetzten Bakterien (Brinkmann et al. 2004). Obwohl die Zellzerstörung intrazellulär erfolgt, kann die inadäquate Freisetzung zytotoxischer Moleküle (Zytokine) in die extrazelluläre Matrix zur Beschädigung des Körpergewebes führen (Weiss 1989).

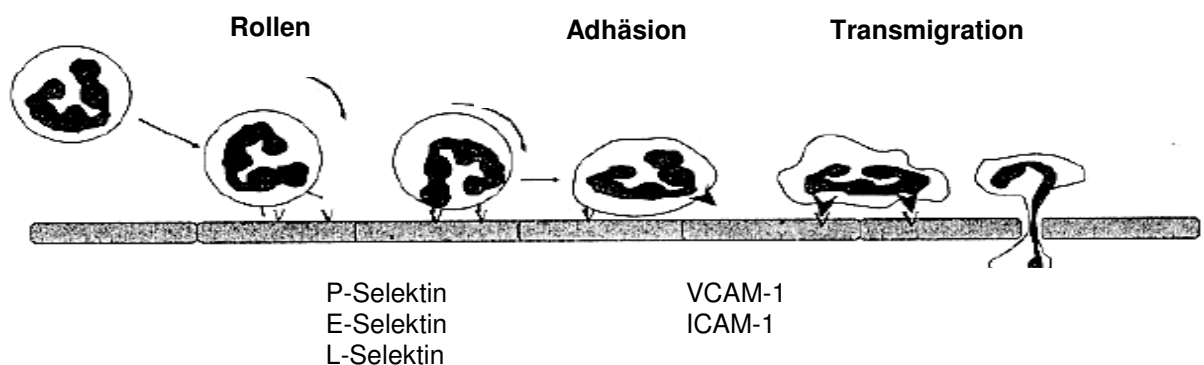


Abb. 2 Neutrophilen-Migration (modifiziert nach Speckmann et al. 2008). Interaktion von Endothelzellen und Neutrophilen.

Aus der Annahme heraus, dass während eines einzigen Insults möglicherweise keine zuverlässige Ursache für ein Multiorganversagen entsteht (Turnbull et al. 1995), entwickelte sich durch das verzögerte Hinzufügen eines weiteren Stress-Faktors die "two-hit"-Theorie. Dieses klinische Entzündungsmodell basiert auf der Tatsache, dass ein initialer traumatischer Insult die Entzündungsantwort „primt“, sodass ein nachfolgender, ansonsten relativ harmloser, entzündlicher Reiz eine überschießende Antwort auslösen kann (Aiboshi et al. 2001). Bezogen auf die neutrophilen Granulozyten wird „priming“ hierbei als ein der Aktivierung vorausgehender Vorgang bezeichnet. Dabei bleiben die Morphologie und die äußerlich messbare Aktivität der PMN zwar unverändert, jedoch werden die für die metabolische Aktivität verantwortlichen Enzymsysteme auf einen zweiten aktivierenden Stimulus vorbereitet und erzeugen in ihrer Gesamtheit die Signaltransduktion. Daneben exprimieren die Granulozyten auf ihrer Zelloberfläche vermehrt Rezeptoren für Stimulanzen wie $\text{TNF}\alpha$, IL1 und IL6 (Tennenberg und Solomkin 1990, Elbim et al. 1994, Jersmann et al. 1998). Dies kann gleichzeitig zu Änderungen des Mediatorenprofils der Entzündungszellen führen (Siegenthaler 2006b). Da die Schwere des septischen Prozesses primär vom Ausmaß und Ablauf der Entzündungsreaktion des Patienten auf die auslösende Noxe abhängt (Morgera et al. 2002), ist durch die übermäßige metabolische Antwort der PMN auf diesen zweiten Reiz eine generalisierte systemische Inflammation zu erwarten und eine adäquate Abwehrfunktion nicht mehr gewährleistet. Daher weisen Patienten nach Operationen und Unfalltraumen mit massivem Blutverlust infolge der Ischämiezeit und Mikrozirkulationsstörungen eine erheblich beeinträchtigte Immunabwehr auf und sind somit für septische Komplikationen besonders anfällig (Meisel 2006).

1.1.3 Apoptose als Pathomechanismus in der Sepsis

Bisher wurde die Theorie vertreten, dass Gewebe- und Organschäden in der Sepsis infolge einer aktivierten pro- und antiinflammatorischen Zytokin vermittelten Reaktion entstehen. Diese Hypothese musste jedoch modifiziert werden, nachdem mehrere Versuche zeigten, dass neben induzierter Inflammation und Antiinflammation auch die Apoptose an der Pathophysiologie der Sepsis bedeutsam zu sein scheint (Oberholzer et al. 2001a, Hotchkiss und Nicholson 2006). So trägt diese entscheidend zur Persistenz der Primärinfektion bei. Hotchkiss beschreibt ein apoptotisch-entzündliches Ungleichgewicht mit Modu-

latoren von Caspasen (CASP) und anderen Komponenten des Zell-Tod-Signalweges (Hotchkiss und Nicholson 2006), auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Apoptose gilt als eine Form des programmierten Zelltodes, der dadurch charakterisiert ist, dass die Zelle genetisch programmiert ist, zu einer vorbestimmten Zeit oder als Folge eines festgelegten Reizes unterzugehen (Majno und Joris 1995). Dies ist sowohl bei physiologischen als auch pathologischen Gewebeveränderungen relevant wie z.B. bei der Entwicklung der Niere oder der Regulierung durch Granulozyten (Oberholzer et al. 2001a, Oberholzer et al. 2001b, Gobe 2009). Dabei handelt es sich um einen energieverbrauchenden Prozess, bei dem eine Zelle zugrunde geht, ohne das umgebende Gewebe in Form einer Inflammation mit einzubeziehen (Schwartz und Osborne 1993, Gill et al. 2002). Im Gegensatz zur Nekrose, einem weiteren bedeutenden Mechanismus des Zelltodes, wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt, ist somit ein Teil des Stoffwechsels der Zelle und unterliegt zudem einer strengen Kontrolle. Darüberhinaus ist Apoptose, zumindest teilweise, reversibel und deshalb möglicherweise beeinfluss- oder umkehrbar (Gill et al. 2002). Der Vorgang der Apoptose lässt sich in zwei Phasen unterteilen: Initiations- und Effektorphase, wobei die erstgenannte wiederum in zwei Vorgänge unterschieden wird: den extrinsischen und den intrinsischen Weg. Beide Wege können nicht unabhängig voneinander gesehen werden.

Die Apoptose unterscheidet sich von den anderen Formen des programmierten Zelltodes durch eine Gruppe von Enzymen, die proteolytische Aktivität aufweisen. Diese sogenannten CASP lösen eine Kaskade aus, die der Verstärkung des apoptotischen Signalwegs dient (Los et al. 1999, Afford und Randhawa 2000, Fischer et al. 2003). Beim intrinsischen Weg kommt es, durch noch nicht genau bekannte Mechanismen, zur Freisetzung von Zytocrom c und anderen proapoptotischen Faktoren (z.B. Mitgliedern der Bcl-2 Familie) aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Ein deutlicher Überlebensvorteil im Tiermodell der Sepsis konnte durch Überexprimierung von Bcl-2 oder Hemmung der CASP demonstriert werden (Weber et al. 2004, Wesche-Soldato et al. 2007). Sogenannte Effektor-Caspasen, wie z.B. CASP3, stehen am Ende der intrazellulären Signaltransduktionswege des programmierten Zelltodes. Einerseits aktivieren sie sekundäre Zielproteine durch limitierte Proteolyse, andererseits sind sie selbst aktiv am Abbau von Laminin (in der Zellkernmembran) und Aktin (Teil

des Zytoskeletts) beteiligt. Die Zelle beginnt aufgrund von Wasserverlust und isoosmotischem Verlust von Ionen im Zytoplasma zu schrumpfen (Bortner und Cidlowski 2000). Folglich kommt es zu Chromatinkondensation und Kernzerfall (Earnshaw et al. 1999). Überdies wird die DNA in hoch- und niedermolekulare Fragmente („nicks“) gespalten (Savill und Fadok 2000). Gleichzeitig findet auch eine Unterdrückung der DNA-Reparatur statt. Letztendlich schnürt sich die Zelle nach und nach in kleinen Vesikeln ab (Thornberry und Lazebnik 1998), die wiederum durch spezialisierte „Fresszellen“ (Phagozyten) aufgenommen werden (Darzynkiewicz et al. 1994).

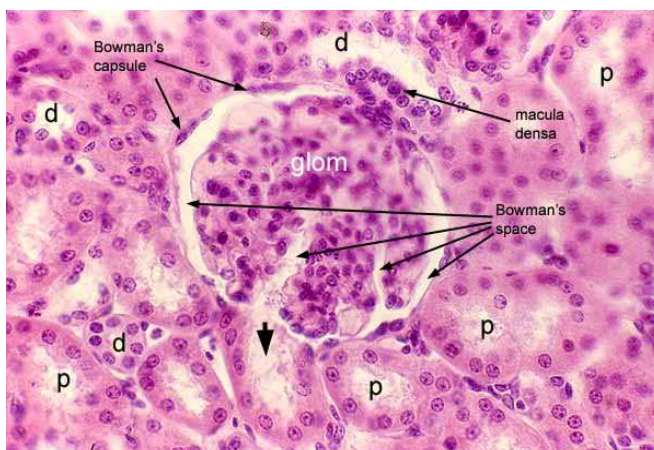
1.2 Aufbau und Funktion der Niere

Das parenchymatöse Organ wird in die außen liegende Nierenrinde (*Cortex renalis*) und das nach innen zum Hilum gerichtete Nierenmark (*Medulla renalis*) unterteilt. Die Nierenrinde enthält 80% der Nierenkörperchen (*Corpusculum renale*, Malpighi-Körperchen) (Schiebler et al. 1999, Baumhoeret al. 2003). Hierbei handelt es sich um kugelförmige Gebilde, die jeweils aus einer Kapsel (Bowman-Kapsel) bestehen, die eine innere und eine äußere Wand besitzt. In die Bowman-Kapsel eingestülpt befindet sich ein feines Kapillarknäuel, das **Glomerulum** (Abb. 3), das für die Funktion des Nierenkörperchens in Form der Blut-Harn-Schranke eine entscheidende Struktur darstellt. Das Blut wird durch den hydrostatischen Druck durch die Glomeruli gedrückt, die aus den folgenden drei Filtern mit unterschiedlicher Porengröße bestehen.

- Die das Glomerulum mit feinen Gefäßen auskleidenden Endothelzellen bilden den ersten Filter. Mit Ausnahme der Blutzellen können praktisch alle Bestandteile des Blutes deren Poren passieren.
- Die Basalmembran erzeugt den zweiten Filter. Diese enthält eine negative elektrische Ladung (durch Proteoglykane) und hält Bestandteile des Blutes, die ebenfalls negativ geladen sind, im Blutgefäß zurück.
- Der dritte Filter besteht aus „Füßchenzellen“, den Podozyten. Diese befinden sich in der inneren Wand der Bowman-Kapsel. Sie haben Fortsätze, die als gleichbleibende Zwischenräume das Durchtreten von größeren Eiweißen verhindern.

Insgesamt ergibt sich eine selektive Permeabilität des Filters nach Ladung und Größe, sodass z.B. Albumin als wichtigstes Plasmaprotein mit 69 kDa, einem Molekülradius von 3,5 nm und negativer Gesamtladung nur in sehr geringem Ausmaß filtriert wird. Blutbestandteile unterhalb dieser Porengröße werden aus dem Glomerulum in ein „Röhrensystem“ gedrückt, das mit der Einstülpung der Bowman-Kapsel beginnt. Diese verengt sich zum Harnpol und geht in den Tubulusapparat des Nephrons über. Dieser wird unterteilt in ein Hauptstück (proximaler Tubulus), ein Überleitungsstück (Intermediärtubulus oder Tubulus *attenuatus*) und ein Mittelstück (distaler Tubulus). Die geraden Abschnitte der Nierenkanälchen und das Überleitungsstück bilden eine Schlinge, die als Henlesche Schleife bezeichnet wird. Schließlich gelangt der Harn in Sammelrohren (Tubulus *renalis colligens*) zum Nierenbecken und wird danach in Harnleiter und Blase geleitet. Die zuerst filtrierte Flüssigkeit, der sogenannte Primärharn, unterliegt dabei umfangreichen Veränderungen.

Über einen Gefäßpol tritt eine kleine Arterie (*Vas afferens*) in die Bowman-Kapsel und bildet als Glomerulum einen Knäuel feinsten Blutgefäße. Ebenfalls über den Gefäßpol verlässt eine abführende Arterie (*Vas efferens*) das Nierenkörperchen. Zwischen den beiden zu- und abführenden Gefäßen befindet sich am Gefäßpol die endokrine Struktur des juxtaglomerulären Apparates mit einer Ansammlung spezieller Zellen. Gebildet werden diese aus den Komponenten der *Macula densa* des distalen Tubulus, dem extraglomerulären *Mesangium* und granulierten Zellen (spezialisierte glatte Muskelzellen der Media an der Endstrecke der *Arteriola afferens*). Der juxtaglomeruläre Apparat reguliert die Durchblutung des Glomerulum und den Filtrationsdruck. Außerdem ist dieser der Hauptbildungsort von Renin, eines Blutdruck regulierenden Hormons.



d = distaler Tubulus
p = proximaler Tubulus

große Pfeilspitze
= Harnpol

(<http://www.siumed.edu/~dki ng2/crr/RN003b.htm>,
aufgerufen am 10.02.2009)

Abb. 3 Lichtmikroskopische Aufnahme Rindenlabrynth.

1.2.1 Renale Pathophysiologie im hämorrhagischen Schock

Der hämorrhagische Schock entsteht durch massiven Blutverlust bei Traumen oder Blutungen im Rahmen operativer Eingriffe. Er ist geteilt in die erste Phase der Hypoperfusion mit Ischämie und bei Wiederherstellung der Durchblutung nach Einleiten einer Volumenersatztherapie in die zweite Phase der Reperfusion.

Infolge der Vasokonstriktion entsteht das klinische Bild der Schockniere, bei der die Nierenrinde entgegengesetzt der Markkapillaren blutarm ist. Durch diese Minderdurchblutung wird über den juxtaglomerulären Apparat das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert, was einem weiteren Volumenverlust entgegenwirken soll. Auf der einen Seite wird über Angiotensin II die adrenerge Vasokonstriktion verstärkt, währenddessen auf der anderen Seite die Sekretion von Aldosteron zu einer vermehrten Rückresorption von Natrium und Wasser aus dem Tubulussystem der Nieren führt. Sind die Tubulusepithelien intakt, entsteht nur wenig konzentrierter Urin mit niedriger Natriumkonzentration. Reichen die aufgeführten Kompensationsmechanismen in der Niere bei anhaltendem Schock nicht aus, um den Kreislauf zu stabilisieren, kommt es zur Unterversorgung des Organs mit einer hypoxischen Endothelschädigung und daraus resultierender Steigerung der Gefäßwandpermeabilität. Lysosomale Enzyme und Thromboplastin („Tissue factor“) werden in das Blut freigesetzt und führen über die Aktivierung der Gerinnungskaskade zu einer DIC. Voraussetzung einer sich hieraus ergebenden Thrombozytenaktivierung mit Thrombusbildung ist die Änderung der Morphologie der Blutplättchen („shape change“), die Sekretion intrazellulärer Granula und die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren, insbesondere des Fibrinogenrezeptors (CD41-CD61). Werden alle Gerinnungsfaktoren verbraucht, kann es im Schockzustand zu schweren diffusen Blutungen kommen. Des Weiteren führt der Ausfall der ATP-abhängigen Pumpsysteme in den hypoxischen Zellen der Niere zu einer Verlagerung von Natrium und Wasser in die Zelle (hydropische Schwellung) und zu einer Ansammlung zytotoxischer Radikale. Die Gewebeödeme können den Stofftransport stören und weitere Organschäden hervorrufen (Plante et al. 1995). Der fortführende Verlauf ist durch ischämische Tubulusschädigung charakterisiert, die zu einer akuten Tubulusnekrose führen kann, die wiederum histologisch pathognomonisch für das akute Nierenversagen (ANV) ist (Krautzig 2000). Während der Reperfusionsphase kommt es zum massiven Anfall von Sauerstoffradikalen, die

zur Schädigung von Zellproteinen sowie zur Störung der DNA und der Zellmembran führen. Zudem treten Granulozyten aus den Gefäßen aus, um die Zelltrümmer zu entfernen. Durch Anlockung weiterer Entzündungszellen können die Nieren in dieser Phase zusätzlich geschädigt werden. Dies wird auch als Reperfusionsschaden bezeichnet. Zur Verbesserung der Perfusion und zur Prophylaxe des Reperfusionsschadens ist der schnelle Einsatz adäquater VEL Therapie der Wahl (Siegenthaler 2006a).

1.2.2 Renale Pathophysiologie im septischen Schock

In Anbetracht der Tatsache, dass Sepsis und insbesondere der septische Schock wichtige Risikofaktoren für die Entwicklung eines akuten Nierenversagens sind (Miyaji et al. 2003), ist wenig über die Pathogenese dieser Dysfunktion bekannt (Tiwari und Vikrant 2000, Bagshaw et al. 2000, Chawla et al. 2007). Nachgewiesen ist jedoch, dass die Entwicklung des septischen ANV eine multifaktorielle Pathogenese umfasst, die im folgenden Abschnitt kurz erläutert werden soll.

Neben der bereits erwähnten Störung der glomerulären Mikrozirkulation (afferente und mesangiale Konstriktion, unzureichende efferente Dilatation) ist eine Störung der medullären Mikrozirkulation (medulläre Kapillarstauung) bekannt, die auf eine Kombination von endothelialer Schädigung und tubulärer Dilatation zurückzuführen ist (Bock 1997). Die veränderte Hämodynamik infolge der Sepsis stellt, laut aktueller Datenlage, nicht die alleinige Ursache des septischen Nierenversagens dar. Nicht-hämodynamische Faktoren wie Endotoxine, sind ebenso an der Induktion und Unterhaltung eines septischen akuten Nierenversagens beteiligt (Churchill et al. 1987, Tiwari und Vikrant 2000), wie die folglich aktivierten septischen Mediatoren. Deren toxische Wirkung auf die Tubuluszellen tragen entweder einzeln oder in Kombination zur Etablierung des akuten Nierenversagens bei (Badr et al. 1986). Diese tubuläre Zellschädigung fördert sowohl den passiven Rückstrom des glomerulären Filtrats in den Tubulus („Back-leak“) als auch den Abbau der Bürstensaummembran. Durch den anfallenden Zelldedritus wird die tubuläre Obstruktion begünstigt (Bock 1997, Schelling und Haller 2000). Steigt der intratubuläre Druck durch die tubuläre Obstruktion über den ohnehin niedrigeren Filtrationsdruck an, kommt es zum Stillstand der glomerulären Filtration (Bock 1998).

Durch Redifferenzierungsvorgänge der überlebenden Tubulus-Restzellfraktion sowie eine gesteigerte Proliferationsrate kann im günstigsten Fall eine anschließende Regeneration bis hin zu *Restitutio ad integrum* stattfinden (Thadhani et al. 1996, Siegenthaler 2006c).

Zudem wurden durch Nissenson sowohl subletale als auch letale Zellschädigungen gefunden (Nissenson 1998), wobei Tubulusepithelien häufig nur subletal geschädigt werden. Es kann auch eine andere Form des Zelltodes induziert werden, z.B. Apoptose, die nicht mit Zeichen einer Nekrose einhergeht und somit oft zu Unrecht als „akute tubuläre Nekrose“ bezeichnet wird (Schrier et al. 2004, Kellum 2008). Diese Form gilt als die wichtigste intrarenale Ursache des ANV (Siegenthaler 2005), wobei die histologischen Kriterien des ANV sehr unterschiedlich sein können. So konnte unter anderem eine interstitielle Infiltration mit polymorphkernigen Leukozyten und begleitendem intrazellulärem Ödem der peritubulären Kapillaren bei ultrastrukturell normalen Glomeruli im septischen ANV nachgewiesen werden (Kikeri et al. 1986). Auch die ansteigende Körpertemperatur, als ein Kriterium der SIRS, fördert die bereits erwähnte hydrophische Schwellung der Zellen durch erhöhten ATP-Verlust (Loer et al. 1999). Hinzu kommen viele schädliche diagnostische und therapeutische Interventionen wie z.B. der Einsatz radiologischer Kontrastmittel und die Verwendung nephrotoxischer Antibiotika, wie Amphotericin B, Aminoglykosid und Rifampizin (Kumar et al. 1992, Taber und Pasko 2008).

Experimentelle therapeutische Ansätze konzentrieren sich bereits auf die Wiederherstellung der Mikrozirkulation (Endothelin-Rezeptor-Antagonisten), die Störung der Adhäsions- und Apoptosemechanismen (Integrin-Rezeptor-Blocker) sowie die Förderung der Nutzung von Wachstumsfaktoren, die offenbar die Reparatur-Prozesse entscheidend beeinflussen (Bock 1997). Ein früher, zielgerichteter Volumenersatz scheint vor allem im septischen Schock signifikante Vorteile zu haben (Rivers et al. 2001, Macias et al. 2004).

1.2.3 Akutes Nierenversagen

Im Rahmen des septischen Schocks kann es, nach einer langen Kette pathologischer Ereignisse, zum Ausfall lebenswichtiger Organe kommen. Studien zufolge beträgt die Prävalenz des akuten Nierenversagens (ANV) verbunden mit einer schweren Sepsis 40% (Oppert et al. 2008). Lediglich die Lunge ist mit

52% noch häufiger betroffen (Bloos 2008). Das ANV ist mit einer hohen Krankenhausletalität assoziiert und hat einen gesonderten, unabhängigen Einfluss auf das Letalitätsrisiko (Chertow et al. 1998, de Mendonca et al. 2000, Schortgen et al. 2001). Prognostisch besonders ungünstig ist das ANV im Rahmen einer Sepsis (Yang et al. 2009) mit Multiorganversagen (25% aller ANV), wobei mit einer Letalität zwischen 50-90% gerechnet werden muss. Nicht selten treten hierbei zusätzlich kardiovaskuläre, respiratorische und metabolische Komplikationen auf. Gegensätzlich früherer Meinungen gilt heute in der Regel der Grundsatz, dass solche Patienten nicht mehr am, sondern mit ANV versterben (Groeneveld et al. 1991, Metnitz et al. 2002, Kellum und Angus 2002, Schindler et al. 2008). Daher besteht die dringliche Notwendigkeit, die genauen pathophysiologischen Erklärungen zum Sepsis induzierten ANV nachzuweisen (Matejovic et al. 2007).

Klinisches Bild: Dargelegt wird das ANV als eine plötzliche, jedoch prinzipiell reversible, Verschlechterung der Nierenfunktion. Parameter hierfür ist der Anstieg der harnpflichtigen Substanzen Kreatinin und Harnstoff im Blut sowie die nur noch eingeschränkte Fähigkeit, den Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Basenhaushalt zu regulieren (Gillum und Brennan 1992, Bartels 1997). Werden die Konzentrationsgrenzwerte des Harnstoffs überschritten (Urämie), kommt es zu einem lebensbedrohlichen Vergiftungszustand, bis hin zu Bewusstseinsverlust und Zusammenbruch der Stoffwechselfunktionen. Zudem ist meist die Wasserausscheidungsfunktion der Niere betroffen, was sich in einem oligurischen bzw. anurischen Verlauf (Oligurie <500 ml Urin/d, Anurie <200 ml Urin/d) äußern kann (Rüter 2004).

Therapie: Grundsätzliches Ziel ist es, die Perfusion und damit die Sauerstoffversorgung der Niere aufrechtzuerhalten sowie den Sauerstoffverbrauch zu reduzieren und damit die Ischämietoleranz der Niere zu steigern. Zusätzliche renale Noxen sind zu vermeiden (Adams 2007). Die wirksamste Prophylaxe des ANV ist die Volumentherapie, wodurch die renale Perfusion verbessert und die Flüssigkeits- und Natriumausscheidung gefördert wird. Ferner wird die Tubulotoxizität vieler nephrotoxischer Agentien (Medikamente, Kontrastmittel, Hämoglobin) bei gesteigerter tubulärer Durchströmung erheblich verringert (Dishart und Kellum 2000). Noradrenalin gilt durch Bereitstellung eines adäquaten Volumenperfusionsdruckes als Vasopressor der ersten Wahl (Aken et al. 2006).

1.3 Grundprinzipien der verschiedenen Volumenersatzlösungen

Die entscheidende Säule der Therapie sowohl des septischen- als auch des hämorrhagischen Schocks ist, neben der Fokussanierung, eine an der zentralvenösen Sauerstoffsättigung orientierte Kreislauftherapie mit dem Einsatz von VEL (Brunkhorst et al. 2007). Ziel der therapeutischen Maßnahmen ist eine Stabilisierung bzw. Wiederherstellung eines suffizienten Blutdruckes und damit die Beseitigung oder Verminderung einer Gewebehypoxie. Somit können die Hypoxie und Ischämie bedingten Schäden, einschließlich der Folgeschäden, während der Reperfusionsphase begrenzt werden. Die Wahl zwischen kolloidalen und kristalloiden Mitteln in diesem Einsatzbereich wird hinsichtlich der Nebenwirkungen kontrovers diskutiert (Marx 2003). Eine Übersicht über die momentan verfügbaren Arten von VEL veranschaulicht Tab. 2.

Tab. 2 Volumenersatzmittel

Kristalloide Lösungen	Kolloidale Lösungen	
	synthetische	natürliche
Ringer-Azetat-Lösung	Hydroxyethylstärke = HES	Humanalbumin
Ringer-Laktat-Lösung	(MW 40, 60, 70, 130, 200 oder 450;	
isotone NaCl-Lösung	Konz 3%, 6% oder 10%; MS 0,38-0,7;	
Glukoselösung	in balancierter oder unbalancierter Lösung)	
Elektrolyt-Infusionslösung E153	Gelatine	
Jonosteril	Dextrane	
Plasma		

MW = mittleres Molekulargewicht (kDa), Konz = Konzentration, MS = molare Substitution

Kristalloide Lösungen sind reine Salz-Lösungen und entsprechen der physiologischen Osmolarität des Plasmas. Neben dem Verdünnungseffekt (Hämodilution) verfügen Kristalloide über einen geringen Einfluss auf die Blutgerinnung und besitzen kaum allergisches Potenzial. Weitere Vorteile sind in den geringen Kosten und einer Diurese steigernden Wirkung festzustellen (Haljamae 1999). Zudem enthalten diese keine Makromoleküle und werden somit nicht onkotisch in der Blutbahn fixiert. Folglich ist ihr Volumeneffekt gering und hält dazu nur sehr kurz an. Daher müssen sie im Verhältnis von drei bzw. vier zu eins infundiert werden, d.h. man benötigt etwa die drei- bis vierfache Menge des verloren gegangenen Volumens (Ottosson et al. 1991, Adams et al. 1998). Die damit verbundene interstitielle Überwässerung mit Neigung zur Ödembildung und verminderter Gewebeoxygenierung stellt einen immanenten

Effekt der Volumensubstitution mit kristalloiden Lösungen dar (Adams et al. 1998, Adams 2007). In Hinblick auf das Sepsisgeschehen können sowohl die systemische als auch die pulmonale Mikrozirkulation geschädigt werden (Arieff 1999). Zudem wird die Möglichkeit einer massiven Elektrolytverschiebung durch Hämodilution im Zusammenhang mit der Entwicklung einer hyperchlorämischen Azidose diskutiert (Stephens und Mythen 2000, Waters et al. 2001).

Balancierte kristalloide Lösungen, wie **Ringer-Azetat-Lösungen**, besitzen isotonische (Osmolalität von etwa 290 mosmol/kg H₂O bzw. eine Osmolarität von etwa 310 mosmol/l) und isoionische Eigenschaften. Von konventionellen Elektrolyt-Lösungen unterscheiden sie sich insbesondere durch den physiologischen Chlorid-Anteil (etwa 103 mmol/l) und den Zusatz von Azetat bzw. Malat anstelle von Laktat (Adams 2007). Ein weiterer Vorteil von Ringer-Azetat-Lösungen gegenüber Laktat-Lösungen scheint in deren verbesserten Anwendbarkeit bei Leberfunktionsstörungen zu liegen, da der metabolische Abbau zu CO₂ auch außerhalb des hepatischen Gewebes stattfindet sowie bei Laktatazidose und Hyperglykämie (Ungemach 2006).

Während in den USA heutzutage in der Therapie Kristalloide bevorzugt eingesetzt werden, ist die Hydroxyethylstärke-Lösung das in Europa, insbesondere in Deutschland, am häufigsten verwendete Kolloid (Sakr et al. 2007). Kolloidale (griech. κολλα , kolla = Leim) Lösungen verfügen je nach Präparat über einen besseren Volumeneffekt als Kristalloide und sind somit schneller in der Lage, einen Volumenmangel zu beheben. So haben jene Zubereitungen, durch den im Vergleich zum Plasma höheren kolloidosmotischen Druck, den Einstrom von Wasser aus dem Interstitium in die Gefäße zur Folge. Ein weiterer Grund für die längere intravasale Verweildauer könnte in der deutlich geringeren Diffusionskapazität sowie einer Steigerung bzw. Erhaltung des kolloidosmotischen Druckes trotz Sepsis induzierten Kapillarlecks zu sehen sein (Marx et al. 2002). Weiterhin minimieren die sogenannten Plasmaexpander die Ödembildung und verbessern darüber hinaus die Sauerstoffzufuhr, was wiederum die Organfunktion entscheidend verbessert (Carlson et al. 1990, Marx 2009). Ferner wird durch die Umhüllung der Blutzellen durch den Kolloid-eigenen Film („Coating“) die Gerinnungsneigung vermindert und die Fließeigenschaft (Rheologie) verbessert. Überdosiert führt dies wiederum zu Gerinnungsstörungen und ist daher dosislimitiert (Karow und Lang-Roth 2006).

Hydroxyethylstärke (**HES**) ist ein Derivat des Stärkemoleküls Amylopektin, welches aus Mais und Kartoffeln gewonnen wird. Durch seine 15-25 Glucose-Einheiten hat es strukturelle Ähnlichkeit mit dem Glykogen der menschlichen Zellen (Dieterich und Unertl 1998). Infolge mannigfaltiger Variationsmöglichkeiten der Derivate ist derzeit eine Vielzahl von klinisch verfügbaren Lösungen auf dem Markt, die sich im Wesentlichen durch Konzentration, Molekulargewicht sowie Substitutionsgrad (Tab. 2) unterscheiden.

Durch Einbringen von Hydroxyethylgruppen in das Molekül wird das Polysaccharid vor dem raschen Abbau durch Serumamylase geschützt, nimmt eine verbesserte Wasserlöslichkeit an und verbleibt länger im Intravasalraum. HES kann aus Amylopektin mittels partieller Hydroxyethylierung hergestellt werden. Diese Substitutionsreaktion kann am C-Atom 2, 3 oder 6 ausgeführt werden, indessen die C2/C6-Substitutionsreaktion eine besondere Bedeutung für die Eliminierungsgeschwindigkeit (Karow und Lang-Roth 2006) und somit Wirkdauer zu haben scheint. Eine Erhöhung der molaren Substitution um 0,1 führt zu einer Verdopplung der Plasma-Halbwertszeit (Serumwerk Bernburg AG 2004). Der Volumeneffekt ist dabei abhängig von der Molekülgröße und der Kolloidkonzentration (3% hypoonkotisch, 6% isoonkotisch oder 10% hyperonkotisch). Die hämodynamische Situation des Patienten, sein individuelles Enzymmuster und seine Nierenfunktion sind dabei nicht zu vernachlässigen (Serumwerk Bernburg AG 2004).

Synthetische Kolloide enthalten, im Gegensatz zu natürlichen Humanalbumin-Lösungen, Moleküle unterschiedlicher Größe, sodass üblicherweise deren Mittelwert angegeben wird.

HES wird auf verschiedenen Wegen aus dem Intravasalraum eliminiert, wobei die metabolische Elimination durch Enzyme, wie z.B. α -Amylase und die zelluläre Elimination durch Speicherung im Retikuloendothelialen System (Sirtl et al. 1999) nur einen geringen Teil ausmachen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass Hydroxyethylgruppen die enzymatische Spaltung verlangsamen. Dies kann mitunter eine langjährige Speicherung zur Folge haben. Zwischen 50-70% der applizierten HES werden renal eliminiert (Lenz et al. 2000), sofern sie die Nierenschwelle unterschreiten. Die maximale Rückresorptionskapazität liegt, je nach Literatur, bei einem MW von 40-100 kDa (Forster et al. 2001, Karow und Lang-Roth 2006). Hochsubstituierte HES 450-Lösung kann demnach schlechter abgebaut werden und wird vermehrt gespeichert (Treib und Haass 1997, Theisen

et al. 2002). Dies hat eine Kumulation zur Folge, die zu einem Anstieg der Serumkonzentration der polydispersen Lösung und zur Erhöhung der Plasmaviskosität führt. Es gibt Hinweise, dass HES die Aktivierung von Endothelzellen und die Ausschüttung einiger Adhäsionsmoleküle hemmt (Nohe et al. 2002). Weitere bekannte Probleme sind, die durch HES induzierten anaphylaktischen Reaktionen bis zu 0,6% der Fälle (Arfors and Buckley 1989), die Speicherung in verschiedenem Gewebe, Juckreiz (Kimme et al. 2001, Eichhorn et al. 2006) und die Beeinflussung der Hämostase und Nierenfunktion (Davidson 2006).

In der Gruppe der kolloidalen VEL existieren neben Plasmaexpandern auch Plasmaersatzmittel, wie **Gelatine** oder niedermolekulare HES. Mit einem plasmatisotonen kolloidosmotischen Druck entspricht der Volumeneffekt nur der zugeführten Menge, da es nicht zu einem Einstrom von Wasser aus dem Interstitium kommt (Treib und Haass 1997), sodass repetitive Applikationen notwendig werden können. Darüber hinaus kommt es im Vergleich zu hochmolekularer HES-Lösung zu keinem Plateaueffekt.

Gelatine-Lösungen bestehen aus Polypeptiden, die durch den Abbau von tierischem Kollagen gewonnen werden. Man unterscheidet succinylierte Gelatine, harnstoffvernetzte oder Oxypoly-Gelatine. Das BSE-Übertragungsrisiko liegt bei <1:1.000.000 (Laubenthal und Sirtl 1998). Bedingt durch die geringe Konzentration und einem MW von nur 30-35 kDa liegen Gelatine-Lösungen unter der Nierenschwelle, haben demnach eine verkürzte intravasale Verweildauer und einen nur begrenzten Volumeneffekt von 0,7% bis zu maximal 1,0%. Es erfolgt eine vollständige Metabolisierung und rasche Elimination über die Niere. Ungefähr 8% werden über den Darm und etwa 1% durch körpereigene Peptidasen abgebaut. Im Gegensatz zu HES ist weder eine Speicherung im Gewebe, noch eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion bekannt. Dementsprechend besteht auch keine Dosiseinschränkung. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass Gelatine-Produkte das Komplement-System aktivieren und vor allem harnstoffvernetzte Gelatine eine Beeinflussung der Fibronectin-Konzentration mit Beeinträchtigung der Fibrinpolymerisation ausübt (Innerhofer et al. 2002, Haas et al. 2007). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnten spezifische Einflüsse auf die Gerinnungsbildung ("Clot-Formation") nachgewiesen werden (Mardel et al. 1996). Zudem ist ein Diurese steigernder Effekt bei Normovolämie bekannt. Anaphylaktoide Reaktionen werden je nach Literaturangabe mit einer Häufigkeit

von bis zu 0,4% angegeben (Laxenaire et al. 1994). Im Gegensatz zu HES, sind in den USA Gelatine-Derivate aufgrund dieser höheren Unverträglichkeitsreaktionen seit dem Jahr 1978 vom Markt genommen worden (Kimme et al. 2001).

1.3.1 Pathomechanismen Volumen induzierter Nierenfunktionsstörungen

Die nachteiligen Effekte von HES-Lösungen auf die Nierenfunktion schwer kranker Patienten bieten einen Ansatzpunkt für kritische Diskussionen (Marx 2009). Bisher haben nur wenige Studien systematisch an diesem Thema gearbeitet, die zudem auch noch zu widersprüchlichen Ergebnissen gelangt sind (Winkelmayer et al. 2003). Offensichtlich tritt im septischen Schock nach HES-Applikation doppelt so häufig akutes Nierenversagen auf, als es bei der Infusion von Gelatine oder bei Volumensubstitution mit einer kristalloiden Lösung der Fall ist (Schortgen et al. 2001, Sumpelmann et al. 2008). Ähnliche Ergebnisse wurden in der deutschen multizentrischen kontrollierten Studie (VISEP) erzielt, in der Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock unter Verwendung von 10% HES 200/0,5 im Vergleich zu Ringer-Laktat signifikant häufiger an ANV (34,9% *versus* 23,2%, $p=0,003$) erkrankten. Zudem beanspruchte diese Patientengruppe einen höheren Bedarf an Nierenersatzverfahren (Reinhart et al. 2008, Brunkhorst et al. 2008). Auch Zander et al. machten darauf aufmerksam, dass biologisch schwer abbaubare HES-Lösungen mit hohem Molekulargewicht einen unabhängigen Risiko-Faktor für ANV bei Patienten mit Sepsis oder septischem Schock darstellen können (Zander et al. 2007). Gegenätzliche Ergebnisse konnten in einer großen multizentrischen europäischen Beobachtungsstudie (SOAP) präsentiert werden, wobei die Verabreichung von HES keinen Einfluss auf die Nierenfunktion und somit auch nicht auf die Notwendigkeit eines Nierenersatzverfahrens hatte (Sakr et al. 2007). In einem Vergleich der Lösungen 6% HES 130/0,42 und 10% HES 200/0,5 eines *in vitro* Sepsismodells zeigten Wittlinger et al. zudem, dass die entzündliche Stimulation unter keiner der beiden HES-Lösungen zu einer Schädigung der proximalen tubulären Zellen geführt hat (Wittlinger et al. 2008). Interessant ist, dass es im Vergleich beider Lösungen unter Verwendung von 10% HES 200 zu einem stärker schützenden Effekt in diesem Sepsismodell kam. Ergänzend dazu be-

richteten Schaper et al. über entzündungshemmende Wirkungen durch HES in einem *in vivo* Sepsismodell in Ratten (Schaper et al. 2008).

Durch unzureichende Hydratation wird tubuläre HES-Speicherung und Vakuolenbildung (Suttner und Boldt 2004, Auwerda et al. 2006) im Sinne einer osmotischen Nephrose (proximale tubuläre Schwellung) beschrieben, die sich negativ auf die Nierenfunktion auszuwirken scheint (Legendre et al. 1993). Jedoch konnte bisher kein pathophysiologischer Zusammenhang zwischen den vakuoligen Veränderungen in den Nierentubuli ("osmotic nephrosis like lesions") und der Nierenfunktionsstörung gezeigt werden. Dem onkotischen Druck der kolloidalen Flüssigkeit kommt dabei vermutlich eine entscheidende Rolle zu, denn ist dieser zu hoch, sinkt die glomeruläre Filtrationsrate (Hauet et al. 1998) und demnach die Urinausscheidung. Daneben werden die hyperonkotischen Moleküle der Kolloide als Verursacher einer erhöhten Viskosität mit nachfolgendem Stillstand der tubulären Strömung gesehen, wodurch sie eine Obstruktion im tubulären Lumen darstellen (Chinitz et al. 1971). Die beobachteten HES-Ablagerungen im Gewebe scheinen dosisabhängig zu sein (Stander et al. 2001, Sirtl et al. 1999). Daher sollte die Wertung HES bedingter renaler Interaktionen nur unter Beachtung der einzelnen HES-Präparate und der infundierten Menge erfolgen (Vogt et al. 1998).

Um die möglichen Pathomechanismen der HES induzierten Auswirkungen auf die Niere zu bewerten, verglichen Hueter et al. 6% HES 130/0,42, 10% HES 200/0,5 mit Ringer-Laktat in einem isolierten Schweinenieren-Perfusionsmodell. Interessanterweise ergaben sich bei allen Volumen-Behandlungen, also auch unter Ringer-Laktat-Infusion, Vakuolen-Bildungen im renalen tubulären Epithel. Dies könnte für ein Epiphänomen ohne klinische Bedeutung sprechen (Hueter et al. 2009). Histologisch wurden eine renale interstitielle Proliferation, Makrophagen-Infiltration und tubuläre Schäden unter HES-Infusion ermittelt, wobei sich im Gegensatz zu 6% HES 130 vor allem durch 10% HES 200 vermehrt Entzündungszeichen zeigten (Hueter et al. 2009). In einer prospektiven Studie wurden ähnliche negative Auswirkungen auf die Transplantatfunktion der Niere infolge HES 200/0,62 Applikation beobachtet (Cittanova et al. 1996). Blasco et al. verglichen erst kürzlich die Effekte von 6% HES 130/0,4 und 6% HES 200/0,6 auf die Funktion von Spendernieren und kamen zu dem Ergebnis, dass HES mit einem niedrigeren Substitutionsgrad im Zusammenhang mit der Nierenfunktion für den Empfänger von Vorteil zu sein scheint (Blasco et al. 2008).

Keine Beeinträchtigung der Nierenfunktion unter HES 200/0,5 nach Transplantation wurde von zwei anderen Studien berichtet (Coronel et al. 1996, Deman et al. 1999).

Im Gegensatz zu HES gibt es von Gelatine nur sporadische Berichte über die Auswirkungen auf Entzündungen und Endothelzellschäden (Adams 2007, Boldt et al. 2008). Patienten im Alter von 80 Jahren wurden in einer Studie während einer kardiochirurgischen Intervention mit 6% HES 130/0,4 oder 4% Gelatine therapiert. Verglichen mit den perioperativen Serumwerten nach Gelatine-Behandlung stellte man am zweiten postoperativen Tag eine signifikante Senkung von IL6, IL10 und ICAM-1 unter HES 130 fest. Demnach sprechen die Ergebnisse für reduzierte Veränderungen in der (kurzfristigen) Nierenfunktion und weniger endotheliale entzündliche Reaktionen verglichen mit Gelatine-Therapie (Boldt et al. 2008). Auch Mahmood et al. verglichen die Wirkung von HES und 4% Gelatine auf die Nierenfunktion anhand von Kreatinin- und Harnstoffspiegeln im Serum sowie Immunglobulin G im Urin und kam zu ähnlichen Ergebnissen (Mahmood et al. 2007). Unter Volumengabe von 6% HES 130/0,4 und 6% HES 200/0,62 verbesserte sich in einem Beobachtungszeitraum von 120 Stunden die glomeruläre und tubuläre Funktion und der renale Schaden ging im Vergleich zur Gelatine-Therapie zurück. Zudem ergab sich in dieser Studie kein Unterschied unter den HES-Lösungen. In einer multizentrischen randomisierten Studie wurde die Häufigkeit von akutem Nierenversagen bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock unter 6% HES 200/0,62 und 3% Gelatine beurteilt (Schortgen et al. 2001). Dabei kam es zu einem signifikant höheren Auftreten eines ANV unter HES 200 mit Serum-Kreatinin-Anstieg und Oligurie.

2 FRAGESTELLUNG

Die Datenlage zur Bedeutung der Nierenschädigung infolge kolloidaler Volumenersatztherapie im septischen Krankheitsbild wird kontrovers diskutiert.

In Anlehnung an das von Turnbull (Turnbull et al. 1995) und Eissner (Eissner et al. 2002) entwickelte tierexperimentelle „two-hit“-Sepsismodell, stellt die Freisetzung sepsisrelevanter Mediatoren wie z.B. IL6 oder TNF α , durch bakterielle Toxine, eine eigenständige pathogenetische Rolle bei der Entstehung eines akuten Nierenversagens dar. Das in dieser Studie verwendete Schockmodell am Schwein ist klinisch relevant und geeignet die Pathophysiologie des akuten Nierenversagens in der Sepsis zu untersuchen.

Ultrastrukturelle Untersuchungen von Nieren mit septischem akutem Nierenversagen zeigen eine interstitielle Infiltration mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN). Da die Bedeutung der Pathomechanismen für den klinischen Verlauf noch Gegenstand der Forschung ist, ist es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Ätiologie des septischen akuten Nierenversagens besser zu verstehen. Hierbei sollen insbesondere reale Auswirkungen verschiedener Volumenersatztherapien auf Zellulärpathologischer- und Genexpressionsebene bezüglich Inflammation und Apoptose überprüft werden.

Es sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Gibt es Unterschiede auf die Induktion von Inflammation und Apoptose in der Niere, in einem kombinierten Schockmodell (hämorrhagischer, konsekutiver septischer Schock) beim Schwein, unter Verwendung verschiedener Volumenersatzlösungen?
2. Lassen sich pathomechanistische Erklärungen finden, um den vermuteten nierentoxischen Effekt einer kreislaufstabilisierenden Therapie mit kristalloiden und kolloidalen Lösungen nachzuweisen?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiermodell

3.1.1 Versuchstiere

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit der Tierschutzkommission (Thüringer Landesamt für Lebensmittel-Sicherheit und Verbraucherschutz, Weimar, D) durchgeführt. Insgesamt wurden 23 klinisch gesunde, weibliche Versuchstiere (deutsche Landrasse) mit einem mittleren Gewicht von 30-35 kg und einem Durchschnittsalter von 3-5 Monaten in die Untersuchung einbezogen. Die Tiere wurden im zentralen Tierlabor (Leiter: Prof. Dr. Schubert) der Friedrich-Schiller-Universität Jena betreut. Alle Tiere stammten aus der Zuchtanlage Fraatz (Pölzig, D) und konnten sich nach dem Transport unter gleichen Haltungsbedingungen (Tag-Nacht-Rhythmus: 12/12 h, Temperatur: ca. $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchte: $\geq 50 \pm 10\%$, Lebensraum: 2x5 m Stall mit Fußbodenheizung) einige Tage eingewöhnen. Die Betreuung in der Gruppe erfolgte über den Zeitraum der Einstellung bis zum Versuchsende durch Versuchstierpfleger. Alle Tiere hatten bis zum Vorabend des Versuchstages freien Zugang zu kommerziellem Schweinefutter und konnten bis zum Versuchsbeginn *ad libitum* Wasser trinken. Versuchsbeginn war in allen Fällen 7.30 Uhr morgens.

3.1.2 Narkoseeinleitung

Nach einer intramuskulären Prämedikation der Versuchstiere mit 4 mg/kg KG Ketamin und 0,3 mg/kg KG Midazolam wurde nach Wirkungseintritt der Prämedikation ein intravenöser Zugang am Ohr des Tieres gelegt. Darüber wurde die Narkose mit 2-3 mg/kg KG Propofol weitergeführt und es erfolgte die Intubation durch einen erfahrenen Tierarzt. Die Narkose wurde mit 8-12 mg/kg KG Propofol, Sufentanyl und Pancuronium unter ständiger Kontrolle der Vitalparameter Blutdruck, Sauerstoffsättigung und Herzfrequenz aufrechterhalten.

Alle Tiere waren während der gesamten Versuchsdauer in Narkose und wurden durch den Anschluss an eine Druck kontrollierte Beatmungsmaschine „Servo Ventilator 900C“ (Siemens-Elema, Schweden) mit 10 ml/kg KG Atemzugvolumen überprüft und mit einem PEEP („Positive Endexpiratory Pressure“) von

5 cm H₂O beatmet. Die Suffizienz der Beatmung wurde ständig anhand der expiratorischen CO₂-Konzentration und der Sauerstoffsättigung kontrolliert.

3.1.3 Sepsisinduktion und Versuchsablauf

Nach Narkoseeinleitung, Intubation und Beatmung schloss sich gebräuchliches intensivtherapeutisches Monitoring an. Dazu wurden folgende Katheter durch chirurgische Freilegung der entsprechenden Gefäße steril eingebracht:

- eine Schleuse in die *V. jugularis externa*, über diese wurde der Pulmonalarterienkatheter zur Messung von pulmonalarteriellen Druck und Herzzeitvolumen (HZV) in die Pulmonalarterie eingeschwenkt;
- ein zentraler Venenkatheter (ZVK) in die *V. jugularis interna* zur Messung des zentralvenösen Druckes (ZVD) und zur Aufrechterhaltung der Narkose;
- ein Picco-Katheter zur Bestimmung des mittleren arteriellen Druckes (MAP), des transpulmonalen HZV, des intrathorakalen Blutvolumens (ITBV) und der Schlagvolumenvarianz (SVV) in die *A. femoralis*.

Eine Mittellinienlaparotomie wurde durchgeführt, um folgende Prozeduren zu ermöglichen:

- Anlegen eines Ileostomas, darüber erfolgte die Einführung eines Tonokapkkatheters, um den pH-Wert und das regionale CO₂ zu bestimmen;
- Anlage eines Blasenkatheters über eine Zystostomie.

Hiernach wurde das Abdomen durch chirurgische Nähte verschlossen und es erfolgte eine orale Einführung eines weiteren Tonokapkkatheters in den Magen zur Messung des regionalen CO₂ als Indikator der Magenperfusion.

Unter ständiger Kontrolle der Vitalparameter wurde nach einer 2 h Ruhephase ein hämorrhagischer Schock induziert. Hierbei wurden durch die Abnahme eines Blutvolumenanteils über die arterielle Schleuse für 45 min der MAP auf 50% der Ausgangswerte gesenkt. Zur Schocktherapie wurde den Versuchstieren danach mittels der entsprechend der Randomisierung ausgewählten VEL das fehlende Volumen retransfundiert. Es folgte eine postoperative Ruhephase

von 8 h, in der die Vitalparameter ständig überwacht und die Narkose aufrechterhalten wurde. Als Zielgröße für die Volumenersatztherapie, der zu untersuchenden Lösungen, war ein ZVD von 12 mmHg definiert. Die durchschnittliche Volumenmenge pro Versuchstier und -gruppe ist im Datenanhang (Tab. 3) dargestellt.

Zur Auslösung eines septischen Schocks infolge einer schweren Peritonitis wurden $8 \times 10^9/\text{kg KG}$ *E. coli* vom O-Serotyp als Fibrin-Clot intraperitoneal eingebracht. Das Transplantat wurde vom Institut für Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena bereitgestellt. Mit der entsprechend ausgewählten Volumenersatztherapie wurde 2 h nach Sepsisinduktion begonnen, wobei es sich in beiden Schockphasen immer um die jeweils gleiche VEL handelte. In den folgenden 10 h verblieb das Versuchstier ebenso in Narkose (Abb. 4).

Ab diesem Zeitpunkt wurden stündlich Blutentnahmen durchgeführt und die erweiterten hämodynamischen Parameter (z.B. HZV, ITBV, SVV) gemessen. Alle anderen Messparameter wurden engmaschig dokumentiert.

Nach insgesamt 23 h Beobachtungsdauer erfolgte die Euthanasie der Tiere in tiefer Allgemeinanästhesie mit einer letalen Dosis Magnesium-Lösung intravenös. Unmittelbar daran wurde die Organentnahme und deren Aufarbeitung vorgenommen.

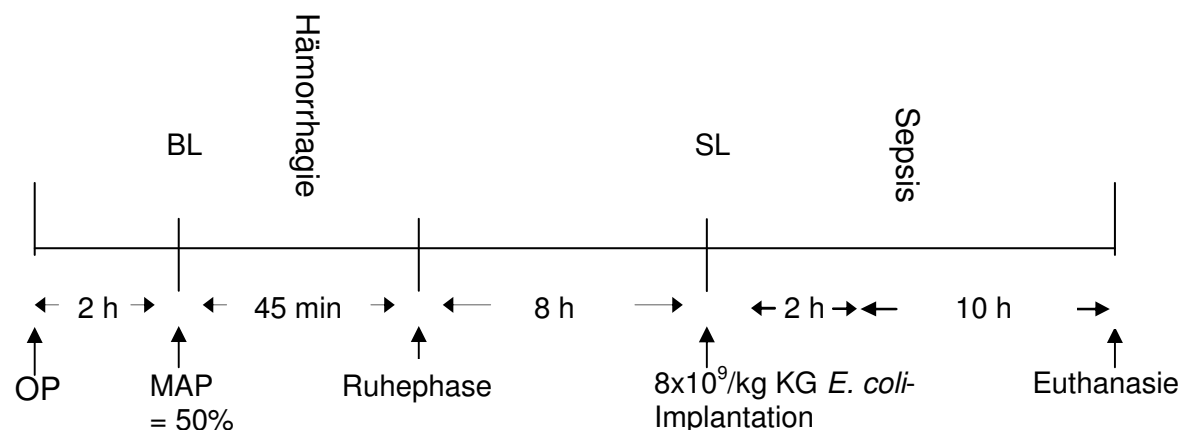


Abb. 4 schematische Darstellung Versuchsaufbau. „Two-hit“-Modell: Als Baseline (BL) wurde die Zeit 2 h nach Operationsende (OP) angesetzt. Anschließend erfolgte der „first-hit“ mittels Einleitung eines hämorrhagischen Schocks für 45 min. Nun folgte eine 8 h Ruhephase mit erstmaliger VEL-Retransfusion. 2 h nach Einleitung des „second-hit“ mittels *E. coli*-Implantation, dem Zeitpunkt der Sepsislinie (SL), erfolgte abermals die adäquate Volumensubstitution der jeweiligen Lösungen.

3.2 Volumenersatztherapie und Gruppeneinteilung

Während der operativen Instrumentierung und anschließenden Ruhephase erhielten alle Tiere Ringer-Azetat-Lösung. Zur Behandlung des hämorrhagischen und septischen Schocks wurden ausschließlich die folgenden randomisierten VEL eingesetzt:

- 6% HES 130/0,42 in balancierter Ringer-Azetat-Lösung;
- 10% HES 200/0,5 in 0,9% isotonischer NaCl-Lösung;
- 4% Gelatinepolysuccinat in balancierter Ringer-Azetat-Lösung;
- balancierte Ringer-Azetat-Lösung.

Die Sham-Tiere wurden in vergleichbarem Ausmaß den anästhesiologischen (Narkoseeinleitung) und chirurgischen (Katheteranlage) Prozeduren unterworfen, jedoch ohne Initiierung des massiven Blutverlustes und der *E. coli*-Implantation. Diese scheinoperierten Tiere dienten somit als gesunde Vergleichsgruppe.

Es handelt sich um eine randomisierte, experimentelle Kontrollstudie, bei der sich die Gruppeneinteilung durch Losverfahren ergab. Nach fünf Vorversuchen mit unterschiedlicher Bakterienanzahl und Therapie ergaben sich folgende Infusionsaufteilungen:

Gruppe	Therapie	Anzahl Versuchstiere
Sham	Ringer-Azetat	3
Sepsis	6% HES 130	5
Sepsis	10% HES 200	5
Sepsis	4% Gelatine	5
Sepsis	Ringer-Azetat	5

Die Auflistung der einzelnen Versuchstiere und deren randomisierte Zuordnung in Therapie-Gruppen befinden sich im Datenanhang (Tab. 4).

3.3 Gewebeentnahme

Nach Beendigung des Versuches erfolgten anhand standardisierter Sektions-technik repräsentative Gewebeentnahmen: beide Nieren, Leber (rechter und linker Leberlappen), Milz, Jejunum, Myokard (Herzscheidewand), beide Lungen (je eine zentrale und eine periphere Entnahme aus allen 5 Lungenlappen). Das Gewebe wurde unmittelbar nach der Entnahme präpariert und

- (a) in 4% Paraformaldehyd zur Gewinnung von Paraffinschnitten und
- (b) in RNA-Later zur Präparation von mRNA aufgenommen.

Das Haupt-Augenmerk dieser Arbeit im Zusammenhang mit den Fragestellungen liegt auf der jeweils rechten und linken Niere eines jeden Tieres.

3.4 Immunhistologische Arbeitsweisen

Alle Reagenzien der folgenden Arbeitsschritte sind chronologisch mit Herstellung und Herstellerfirma im Anhang (8.1) aufgeführt.

3.4.1 Gewebeaufbereitung

Durch einen Sagittalschnitt beider Nieren erhielt man jeweils einen Blick auf das Mark und die Rinde der Niere. Diese Organproben wurden in Biopsiekassetten, die mit einer Probennummer und dem Datum der Entnahme versehen wurden, eingeschlossen und 24 bis 48 h in 4% Paraformaldehyd kühl gelagert. Zum Waschen der Gewebeproben wurden diese 30 min mittels Magnetrührer in 1x PBS gespült. Anschließend wurden die Proben über 24 - 48 h in 70% Ethanol kühl gelagert und dann in den Entwässerungsautomaten „Histokinette“ (Fa. Leica TP 1020) eingebracht. Hier wurden die Gewebekassetten durch schrittweise Überführung in eine aufsteigende Alkoholreihe von 2x 70% EtOH, 2x 96% EtOH, 3x 100% EtOH, 1x über ein Gemisch aus 1:1 100% EtOH und reinem Xylol und 2x in Xylol entwässert. In zwei aufeinanderfolgenden Paraffinbädern wurden die Gewebekassetten schließlich in flüssigem ca. 58°C heißem Paraffin gelagert. Die Gesamtdauer betrug ca. 12 h (jeweils eine Stunde pro Medium). Nach der Entwässerung wurden die Proben am „Einbettautomat“ (Fa. Leica EG 1160) zu Paraffinblöckchen eingegossen. Die Blöckchen konnten nun bei Zimmertemperatur gelagert werden. Einen Tag vor dem Schneiden wurden sie bei -20°C eingefroren, um den Schneidevorgang zu erleichtern. Die Nieren wurden am Rotationsmikrotom (Fa. Leica RM 2165) auf eine Dicke von 4-6 µm geschnitten, im Wasserbad auf beschriftete Objektträger (OT) gezogen und nach Trocknung bei Raumtemperatur gelagert.

3.4.2 Entparaffinierung

Im Folgenden werden die histologischen und immunhistologischen Färbungen beschrieben. Für eine sichere Bindung des Primärantikörpers am Antigen zur

spezifischen Anfärbung ist eine vollständige Entparaffinierung, der in Paraffin eingebetteten Schnitte notwendig. Dazu wurde das Gewebematerial für 10 min in Xylol, dann für weitere 5 min in frisches Xylol, 2x 2 min in 100% EtOH sowie jeweils 2 min in 96% EtOH, 80% EtOH, 60% EtOH, 50% EtOH (absteigende Alkoholreihe, Verdünnung mit Aqua dest.) und abschließend für 2 min in Aqua dest. gestellt.

3.4.3 Eingesetzte Färbetechniken

a) Histopathologische Übersicht (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

Als routinemäßige Übersichtsfärbung eignet sich die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), da sie eine, ausschließlich auf morphologischen Kriterien basierende, rasche histopathologische Beurteilung erlaubt (Boenisch 2006). Zudem ist sie einfach anzuwenden, standardisiert, zuverlässig und aufschlussreich (Stevens und Lowe 1997).

b) Darstellung der PMN-Migration (Esterase-Färbung)

Die Esterase wird spezifisch in Knochenmarkszellen exprimiert und färbt dadurch vorwiegend neutrophile Granulozyten. Im vorliegenden dient sie als Spezialfärbung zur Beurteilung des Entzündungsausmaßes, indem PMN in der Niere angefärbt werden. Zelleigene Esterase bewirkt dabei enzymatische Hydrolyse des Substrates von Naphtol AS-D Chlorazetat zu einer Naphtolverbindung, die in einer Kopplungsreaktion mit einem Diazoniumsalz zu einem wasserunlöslichen, rotvioletten Azofarbstoff reagiert.

Nach der Entparaffinierung bediente man sich der Zytochemischen Reagenzien von Leucognost® NASDCL und deren Färbeprotokoll.

1. Schnitte 30 min in frisch bereiteter Färbelösung C bei Raumtemperatur belassen
2. 5 min waschen in Aqua dest.
3. 30 sec Gegenfärbung in Hämatoxylin
4. 5 min waschen in Leitungswasser und 1 min in Aqua dest.
5. Eindeckung mittels Aquatek

c) Visualisierung der Apoptoserate (TUNEL-Färbung)

Bei der sogenannten TUNEL (Terminal-Transferase-Uridin-Nick-End-Labeling)-Methode handelt es sich um eine weit verbreitete Methode zur Erkennung von Apoptose in Gewebeschnitten. Während der Apoptose wird der DNA-Strang des Zellkerns durch die Aktivität der Ca^{2+} -abhängigen Endonuklease fragmentiert. Freiwerdende Hydroxylgruppen ($3'\text{-OH}$ -Gruppen) werden durch enzymatische Vermittlung der Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) mit markierten Nukleotiden versehen. Der Nachweis der kondensierten Kerne wird mittels Chromogen DAB (braun) sichtbar gemacht.

Zur Durchführung dieser Färbung wurden zwei konsekutive Gewebeschnitte auf einem OT vorbereitet. Ein Schnitt wurde als Probe, der zweite zum Ausschluss falsch positiver Färbereaktionen als Negativkontrolle, ohne TdT-Enzym, verwendet. Es ist davon auszugehen, dass man interstitiell überwiegend Fibroblasten und Leukozyten anfärbt (Seegerer et al. 2002, Alpers 2003).

Methodische Probleme bei der Gewebefixation und das Ausmaß an Proteolyse in den Zellen führen nicht selten zu falsch positiven als auch falsch negativen Ergebnissen (Saraste 1999, Kang und Izumo 2000). Somit wurde vor Experimentbeginn durch Änderungen in der Hitzevorbehandlung, in der Verdünnung des Anti-Digoxi-POD als auch durch Erprobung geeigneter Puffer, Verbesserungen der Färbequalität erzielt (Shi et al. 1995, Labat-Moleur et al. 1998). Neben Citrat-Puffern, die verschiedene pH-Werte von pH 5, pH 6 pH 7,5 aufzeigten, wurde auch mit Tris-Puffer pH 7,5 und pH 9; Tris/EDTA pH 9,5; Trypsin und Protease K experimentiert. Die besten Ergebnisse, zum Schutz der Proteine vor einer Denaturierung, konnten mit einer Hitzevorbehandlung in Citrat-Puffer pH 6 (Boenisch 2006) erreicht werden.

Die im Folgenden aufgeführten Schritte ließen die Färbung des Nierenparenchyms mittels der TUNEL-Methode zu.

1. Hitze induzierte Antigendemaskierung: 20 min Inkubation der OT in 1x Citrat-Puffer bei 80°C in Dampfgerät
2. Abkühlung: bei Raumtemperatur durch schrittweise Zugabe von 1x Citrat-Puffer für mindestens 20 min, waschen unter fließendem Aqua dest. für 3 min, Umrandung der Schnitte mit wasserfestem Stift auf Unterseite des OT
3. Deaktivierung der endogenen Peroxidase: 10 min Einwirkung von 150 µl von 3% H_2O_2 auf jedem Schnitt bei Raumtemperatur
4. Enzymreaktion: während des Waschens unter fließendem Aqua dest. für 3 min mischte man im Verhältnis 1:3 TdT Enzym und Reaktions-Puffer, Pipettierung von jeweils 20 µl vom Enzymgemisch auf den oberen Schnitt des OT und 20 µl 1x PBS als Negativkontrolle auf den unteren Schnitt; zum Schutz vor Austrocknung und Vermischung deckte man die einzelnen Schnitte mit Parafilm® ab, Inkubation für 1 h in Feuchtkammer bei 37°C

5. Blockierung: 150 µl von 1% Donkeyserum auf einen Schnitt für 10 min
6. Anti-DIG-POD-Reaktion: Abkippung des Serums, Auftragung von 150 µl des verdünnten Anti-Digoxigenin-POD pro OT, Parafilmabdeckung, Inkubation für 30 min in Feuchtkammer bei 37°C
7. DAB-Färbung: waschen unter fließendem Aqua dest. für 10 min, Auftragung von 150 µl der DAB Mischung auf jeden Schnitt für 10 min
8. Gegenfärbung mit Hämalaun: waschen mit Aqua dest. für 10 min, Entfernung der Unterseiten-Markierung mit 100% EtOH, Behandlung mit Hämalaun für 15 sec, anschließende 10 min Bläuung unter fließendem Leitungswasser
9. Eindeckung: danach erfolgte eine Dehydrierung der Paraffinschnitte in aufsteigender Alkoholreihe, Xylol und abschließender Eindeckung mit Entellan

d) Darstellung des glomerulären Bindegewebsgerüsts (Jones-Färbung)

Die Perjodsäure-Silber-Methenamin-Imprägnation nach Gomori charakterisiert das glomeruläre Bindegewebsgerüst, indem Glykoproteine durch Versilberung in der Basalmembran dargestellt werden.

1. Behandlung mit 1% Perjodsäure für 10 min
2. waschen in Aqua dest.
3. 30-90 min vor Auftragung der Silber-Methenamin-Lösung, diese auf 65°C erhitzen
4. waschen in Aqua dest.
5. Färbung in 0,2% Goldchlorid-Lösung
6. waschen in Aqua dest.
7. leichte Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eosin
8. waschen in Wasser
9. Eindeckung mit Entellan

e) Darstellung des Bürstensaumes (Lektin-Färbung)

Lektine sind Proteine, die spezifisch an bestimmte Saccharide der Zellmembran binden (Walker 1989). Das Lektin *Phaseolus vulgaris erythroagglutinin* (PHA-E) bindet spezifisch an den intakten Bürstensaum einer proximalen Tubulusepithelzelle (Silva et al. 1993). In Abhängigkeit der PAH-Bindung kann somit indirekt über die Detektion eines intakten Bürstensaumes der akute Tubulusepithelschaden quantifiziert werden. Als Negativkontrolle wurde an Stelle des PHA-E nur Antikörper-Verdünnungslösung aufgetropft.

1. Behandlung für 10 min mit 3% H₂O₂ in 70% Ethanol
2. kurz in Aqua dest. waschen, 2x PBS für jeweils 5 min
3. enzymatische Vorbehandlung mit Trypsin für 20 min bei 37°C Inkubation, 2x TBS
4. 30 min Präblock (Zytomed, Reagent 1), 2x TBS
5. Blockierung des endogenen Biotin mit Avidin/Biotin Blocking-Kit (nach Angaben des Herstellers) jeweils für 15 min bei Raumtemperatur
6. Inkubation mit biotinyliertem Antikörper PHA-E bei Raumtemperatur für 60 min in feuchter Kammer, 2x TBS
7. 60 min bei Raumtemperatur Streptavidin Peroxidase Konjugat verdünnt in Antibody-diluent 1:1600, 2x TBS
8. 8 min Inkubation mit SG-Kit, 2x TBS, kurz in Aqua dest. waschen
9. Eindecken mit Entellan

f) Darstellung der Fibrinablagerung (MSB-Färbung)

Um Fibrin darstellen zu können, wählt man die Martius-Scarlet-Blue-Färbung (nach Lendrum). Hierbei stellen sich die Erythrozyten gelb, Fibrin und glatte Muskelzellen rot sowie Kollagen und Zellkerne blau dar (Modarai et al. 2005).

1. 5 min Färbung in Weigert's Hämatoxylin
2. waschen in Leitungswasser und kurz in Aqua dest.
3. 3 min Färbung in Martius yellow Gebrauchslösung (0,5%) mit anschließendem Waschen in Leitungswasser
4. Färbung mit Kristallponceau (1%) für 10 min, kurz in Aqua dest. waschen
5. 30 sec Färbung mit Anilinblau (0,5%)
6. spülen unter Leitungswasser und Eindeckung mit Entellan

g) Darstellung von Glycogenspeicherung (PAS-Färbung)

Die Perjod-Acid-Schiff'sche-Reaktion (nach McMannus) ist eine histochemische Reaktion zum Nachweis von bestimmten Kohlenhydraten, deren Glykolgruppen durch die Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert werden. Diese reagieren mit dem Schiff'schen Reagens und bewirken eine rot-violette Farbe. Glykogenreiche Zellen findet man z.B. in Bindegewebsfasern (Kollagen), Basalmembranen und Zellwänden (Glykokalix). Die folgenden Färbeschritte wurden mittels kommerziell erhältlichem PAS-Färbesystem durchgeführt.

1. 5 min Perjodsäure-Inkubation (0,5 %) bei Raumtemperatur
2. waschen in Aqua dest.
3. 15 min Inkubation mit Schiff's Reagens (fuchsin-schweflige Säure) bei Raumtemperatur
4. waschen mit Leitungswasser
5. Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 1 min
6. waschen mit Leitungswasser

3.4.4 Morphometrische Auswertung der histologischen Präparate

Die Auswertung der Färbungen erfolgte anhand eines Durchlichtmikroskops (Olympus Provis AX 70, Fa. Carl Zeiss, Jena), während für die Dokumentation der histologischen und immunhistologischen Untersuchungen ein Photomikroskop (Typ Axio Cam MRc5, Fa. Carl Zeiss Oberkochen) zur Verfügung stand. Anschließend wurden die Fotos mit AxioVision AC Rel. 4.5 (Fa. Carl Zeiss) bearbeitet und gespeichert. Zu keinem Zeitpunkt der Bildverarbeitung wurden nicht-lineare Kompensationstechniken eingesetzt. Die Validierung und Auswertung einzelner Histologie- und Immunhistologietechniken konnten in Kooperation mit dem Institut für Pathologie, Medizinische Hochschule Hannover (MHH) durchgeführt werden. Unklare Zellverhältnisse sind dokumentiert und einem unabhängigen externen sachverständigen Pathologen (Dr. med. Clemens Bockmeyer) vorgelegt worden, der in Unkenntnis der Gruppenzuordnung der Gewebeproben war.

Evaluation der Zahl inflammatorischer und apoptotischer Zellen

Für alle Untersuchungen wurden Nierenschnitte zwischen 4 und 6 µm verwendet. Die Auszählung wurde verblindet und mittels einer Doppelzählung der jeweils rechten und linken Niere eines jeden Versuchstieres durchgeführt.

Während man sich bei den übrigen Färbungen initial deskriptiv an den Effekten der typisch gefärbten Bestandteile eine allgemeine Übersicht über die Dimension des Gewebeschadens erarbeitete, quantifizierte man sekundär eine statistische Auswertung in Hinblick auf die Fragestellungen. Sowohl Entzündungszellen als auch apoptotische Zellen konnten durch Zellzählung bei einer 40x Vergrößerung in der Niere mittels Esterase- und TUNEL-Färbung dargestellt werden. Bei beiden immunhistologischen Färbungen wurde die Auszählung von 40 Gesichtsfeldern für den Tubuli-interstitiellen Raum und von 40 Gesichtsfeldern für die Glomeruli gewählt.

Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse

Mithilfe der Software SPSS 15,0 konnten verschiedene statistische Kenngrößen (Median, 1. und 3. Quartil sowie Interquartilbereich) für die deskriptive Charakterisierung der Stichprobenverteilung ermittelt werden, um mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen und graphisch darzustellen. Da lediglich ein kleiner Stichprobenumfang zur Verfügung stand und damit keine

genaue Aussage über die Normalverteilung der Daten möglich war, sind nicht-parametrischen Tests herangezogen worden. In der vorliegenden Studie wurde eine verteilungsfreie Varianzanalyse nach dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Dieser zeigte auf, dass unterschiedliche VEL einen Einfluss auf das Ausmaß von Entzündungs- bzw. Apoptosezellen in den verschiedenen Kompartimenten der Niere haben. Jedoch konnte damit nicht angegeben werden, unter welchen Gruppen dieser Unterschied besteht. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses beim Kruskal-Wallis-Test ist für jedes Kompartiment ein paarweiser Vergleich der VEL mittels Mann-Whitney-*U*-Test angeschlossen worden. Daneben wurde bei der geringen Fallzahl an Versuchstieren die exakte Signifikanz auf dem lokalen Niveau von $p\text{-Wert} \leq 0,05$ akzeptiert.

Mittels eines Boxplots erfolgte die graphische Darstellung der erfassten Daten, bei dem der Median, das obere und untere Quartil sowie der Minimal- und Maximalwert dargestellt werden.

Evaluation des intakten Bürstensaumes an Tubulusepithelien

In Analogie der beschriebenen Methode zur Bindung von PHA-E an Tubulusepithelien (Hill et al. 2007) wurden bei den septischen Tieren jeweils von der rechten Niere und bei den Sham-Tieren von beiden Nieren Paraffinschnitte angefertigt. Zur quantitativen Visualisierung des Signals wurden jeweils von diesen Schweinenieren drei Bilder (100x Vergrößerung) mit einem neu entwickelten Computerprogramm ausgewertet. Eine Publikation zur Beschreibung dieser Methode wurde bereits vom Institut für Statistik der MHH eingereicht (David et al. 2009, American Journal of Physiology - renal physiology). Hierbei wird zunächst eine bestimmte Farbe berechnet, mit der eine optimale Diskriminierung zwischen Hintergrundsignal und gebundenem PHA-E möglich ist. Im Anschluss wird die Differenz der Farbpixel (Hintergrundsignal und PHA-E-Signal) gebildet und der Median von drei ausgewerteten Bildern kalkuliert (Pixel count). Als statistischer Test wurde der Mann-Whitney-*U*-Test ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) angeschlossen. Als nützliche Zusammenfassung des vorliegenden Datensatzes erfolgte auch hier die graphische Darstellung in Form eines Boxplots.

3.5 Molekularbiologische Methode

3.5.1 RNA-Isolierung

Die in RNA-later™ (QIAGEN, Hilden, D) zur Stabilisierung der RNA aufgenommenen Gewebeteile der Niere wurden in RNase freien 0,5 ml Tubes bei -80 °C gelagert. Bei der Lagerung sowie dem Transport auf Trockeneis war zu jedem Zeitpunkt eine ununterbrochene Kühlkette gewährleistet.

Zur schnellen und zuverlässigen RNA-Isolation hat sich bei den folgenden Untersuchungen der RNeasy® Mini-Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D) bewährt, der folgende Komponenten enthält: RLT-Puffer, RW1-Puffer, RPE-Puffer, RNeasy Mini-Säulen und RNase freie 1,5 ml Tubes. Jeweils 30 mg Nierengewebe wurde abgewogen und in 600 µl RLT-Puffer (mit 10 µl 2-Mercapto-EtOH, Sigma pro 1 ml RLT-Puffer versetzt) gegeben. Anschließend erfolgte eine Lyse des Gewebes durch einen Scherstresshomogenisator (Miccra D-1), der nacheinander mit RNA-later, RNase freiem Wasser (DEPC-treated water) und 70% RNase freiem EtOH gespült wurde. Folglich wurden Zelltrümmer abzentrifugiert (16000x g, Moel 5415D, Eppendorf) und der Überstand im Verhältnis 1:1 mit 70% Ethanol vermischt. Auf die Säulen wurden jeweils 700 µl des Materials pipettiert und 15 sec zentrifugiert (8000x g). Das Eluat wurde verworfen und nach vollständiger Probenzentrifugation wurden 700 µl RW1-Puffer zum Waschen auf die Säule gegeben. Nach dem gleichen Zentrifugationsschema und wiederholtem Waschen wurde abermals das Eluat abgetragen. Die Säulen wurden nun in neue 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße versetzt und bei 2 min Zentrifugation getrocknet. 30-50 µl des leicht angewärmten RNase freien Wassers wurde direkt auf die Membran der Säulen pipettiert und 1 min bei 40 °C auf einem Thermoblock (Bio-Rad) inkubiert. Nach abschließender 1 min Zentrifugation (8000x g) erhielt man eine wässrige RNA-Lösung als Eluat im Tube.

Zur Qualitätskontrolle der extrahierten RNA wurde in 1 µl der jeweiligen RNA-Probe anschließend die Lichtabsorption mittels Nano-Drop® ND-1000 Spektralphotometer (Software: NanoDrop ND-1000 3.1.2) bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm und einer Schichtdicke von 1 mm gemessen. Aus jeweils drei Messungen einer Probe wurde der Mittelwert bestimmt. Zusätzlich stellt die photometrische Analyse niedermolekulare Verunreinigungen durch Quotientenbildung OD_{260}/OD_{280} dar. Es wurden lediglich Proben eingesetzt, de-

ren Quotient zwischen 1,7 und 1,8 bestimmt wurde. Eine OD_{260} entspricht 40 $\mu\text{g/ml}$, wobei sich die Nukleinsäurekonzentration somit nach folgender Formel berechnet:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = OD_{260} \text{ nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \text{ (für RNA)}$$

Die Lagerung der RNA-Lösung erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung ebenfalls bei -80°C .

3.5.2 Denaturierende elektrophoretische Trennung von RNA

Um die Integrität und Reinheit der RNA zu prüfen, wurde eine denaturierende RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Ethiumbromidmoleküle interkalieren dabei zwischen den Basen der RNA mit Veränderung des Anregungsspektrums. Folglich erhöht sich die Fluoreszenz des Farbstoffes bei Anregung mit ultraviolettem Licht. Die Lichtintensität verhält sich dabei proportional zur vorliegenden RNA-Konzentration sowie zur Länge der Nukleinsäure.

Für die Realisierung dieser Prozesse benötigt es eine Reihe spezieller Puffer, die in Tab. 5 chronologisch nach der Durchführung der Arbeitsschritte aufgelistet sind.

Tab. 5 **Pufferherstellung für RNA-Analyse**

10x FA-Gel-Puffer	200 mM MOPS (freie Säure) 50 mM Na-Azetat 10 mM EDTA auf pH 7,0 mit NaOH einstellen
1x FA-Lauf-Puffer	50 ml 10x FA-Gel-Puffer 10 ml 37% Formaldehyd-Lösung 440 ml Aqua dest.
5x RNA Loading-Puffer	0,016 ml gesättigte wässrige Bromphenolblau-Lösung 0,08 ml 500mM EDTA (pH 8,0) 0,720 ml 37% Formaldehyd 2,0 ml 100% Glycerol 3,084 ml Formamid 4,0 ml 10x FA-Gel-Puffer 0,1 ml RNase freies Wasser

Für die Gelpräparation wurde 0,48 g Agarose (Invitrogen™, Life Technologie) in 36 ml Aqua dest. suspendiert und anschließend für einige Minuten in der Mikrowelle (Fa. Monacia) bis zur vollständigen Auflösung erhitzt. Nach Zugabe von 4ml 10x Gel-Puffer und einer Abkühlung auf 65 °C erfolgte die Beifügung von 1,8 ml 37% Formaldehyd-Lösung sowie 1 µl (10 mg/ml) Ethidiumbromid (Sigma) zum Anfärben der Banden. Dieses Gemisch wurde anschließend sofort in eine nivellierte Elektrophoresekammer (Owl Separation Systems, Easy Cast) gegossen und in Gelkämme eingesetzt. Nach ca. 1 h war das Gel polymerisiert und konnte nun 30 min in 1x FA-Gellauf-Puffer äquibriilliert werden.

Derweil wurden die Proben auf Eis aufgetaut und 1 µl Probe (Gesamtmenge ca. 1 µg) mit 4 µl RNase freiem Wasser und 1 µl 5x RNA-Loading-Puffer vermischt. Nach Denaturierung durch 5 min Aufheizung auf 65 °C im Thermocycler (Bio Rad) wurden die Proben sofort wieder für mindestens 2 min auf Eis gestellt und nach Kammentfernung zügig in die Geltaschen gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei einer Spannung von 60 V. Die RNA-Wanderung dauerte ungefähr 2 h. Abschließend wurde das Gel im UV-Detektionsgerät (Fa. Herolab) visualisiert und mittels geeigneter Software (easyWin32) wurden die Resultate dokumentiert. Als positiv wurde das Ergebnis gewertet, wenn zwei scharfe Banden (entsprechend 18S und 28S ribosomaler RNA) erkennbar waren, wobei die 28S Bande eine ca. 2x erhöhte Intensität aufwies.

3.5.3 cDNA-Synthese

Nach bereits transkribierter Arbeitskopie eines Gens der RNA, genannt „messenger“-RNA (mRNA), wird nun durch Zuhilfenahme von Reverser Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) eine doppelsträngige codogene DNA (cDNA) gewonnen. Deren Herstellung erfolgte mittels cDNA Synthesis-Kit (Bioline GmbH, Luckenwalde, D). Zum Erreichen einer Standardisierung wurde nach spektrophotometrischer Messung eine RNA-Konzentration von 1,00 µg RNA-Probe auf insgesamt 10,00 µl RNase freiem Wasser (DEPC) eingestellt. Für den Versuchsansatz wurden folgende Lösungen eingesetzt:

RNA (1,0 µg)	10,00 µl
Oligo 18 Primer-Mix	1,00 µl
<u>dNTP-Mix 10 mM</u>	<u>1,00 µl</u>
Gesamtvolumen	12,00 µl

Es wurden Oligo-Primer eingesetzt, die spezifisch an den poly-Adenin-Schwanz der mRNA binden. Im Peltier Thermal Cycler (Biorad) wurden die Proben für 10 min bei 65 °C denaturiert und anschließend für 2 min auf Eis gestellt. Vor Beginn der Reversen Transkription wurden 8,00 µl RT-Mix hinzugefügt (Gesamt volumen 20,0 µl):

5x Bioscript-Puffer	4,00 µl
RNase-Inhibitor	1,00 µl
Bioscript (200 Units/µl)	0,25 µl
<u>RNase freies Wasser</u>	<u>2,75 µl</u>
Gesamtvolumen	8,00 µl

Im Thermocycler wurde nun folgendes Programm gefahren:

Primer-Anlagerung und Extension	42 °C	50 min
Denaturierung	70 °C	15 min
Kühlung	4 °C	<12 h

Die Proben wurden auf eine Endkonzentration von 5,00 ng/µl, bezogen auf die eingesetzte RNA-Menge, eingestellt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

3.5.4 Primerdesign

Für die Aussagekraft der in einer qRT-PCR gewonnenen Daten ist es unabdingbar, im Vorfeld die eingesetzten Primer zu überprüfen. Hierzu wurde nach Literaturrecherche geeigneter schweinespezifischer Primer (www.pubmed.com) in einer Genomdatenbank (www.ensembl.org) die Transkriptsequenz ermittelt und in einem Primerdesignprogramm (<http://frodo.wi.mit.edu/>) die entsprechenden Primer generiert. Folgende Kriterien mussten die Primer erfüllen:

- resultierendes Transkript < 200 bp;
- Forward- und Reverseprimer binden in zwei verschiedenen Exons;
- Annealingtemperatur beider Primer ≥ 60 °C;
- Länge der Primer ≥ 20 bp;

- Forward- und Reverseprimer unterscheiden sich in der Länge um maximal 2 bp;
- keine homologen Sequenzen innerhalb der Primer, um Primerdimere zu vermeiden;
- Abgleich des entstehenden Produktes in einer Genomdatenbank um Co-Amplifikate ausschließen zu können.

Die Synthese und Bereitstellung der Primer erfolgte durch biomers.net GmbH (Ulm, D). Die schweinespezifischen Primer zum qualitativen und quantitativen Gennachweis, die Länge des zu synthetisierenden DNA-Abschnittes und die Länge des Amplifikats werden nachfolgend tabellarisch aufgeführt (Tab. 6).

Tab. 6 Übersicht zu den verwendeten schweinespezifischen Primern

<i>Gen</i>	<i>Primer</i>	<i>bp</i>
P53	fw 5`-CGA ACT GGC TGG ATG AAA AT-3` rv AGA AGG GAC AAA GGA CGA CA-3`	125
TNF α	fw 5`-CCG ACT ATC TGG ACT TTG CTG-3` rv 5`-GTG AGG GGG TCT GAA GGA GTA-3`	126
IL6	fw 5`-CAG CTA TGA ACT CCC TCT CCA C-3` rv 5`-CAC CTT TGG CAT CTT CTT CC-3`	120
CASP3	fw 5`-GAC CAT AGC AAA AGG AGC AG-3` rv 5`-TCT ACA GCA GTC CCC TCT GAA-3`	129
C/EBP- β	fw 5`-ACA GCG ACG AGT ACA AGA TCC-3` rv 5`-ACA GCT CCA CCT TCT TCT-3`	153
ACTB	fw 5`-CTG GAC TTC GAG CAG GAG AT-3` rv 5`-GGA AGG AGG GCT GGA AGA-3`	121

Da die Konzentration jedes Primers in der gelieferten Lösung bekannt war, konnte die erforderliche Konzentration der Primer in der PCR jeweils durch Zugabe einer festgesetzten Menge von RNase freiem Wasser vorbereitet werden. Anschließend erfolgte die Lagerung der Primer bei -20 °C.

3.5.5 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR basiert auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals, das während der Amplifikation proportional zum PCR-Produkt entsteht (Lee et al. 1993, Livak et al. 1995). Im Gegensatz zur Endpunkt-Detektion einer konventionellen semi-quantitativen PCR ermittelt die qRT-PCR die während jedes Zyklus` emittierende Fluoreszenz als einen Parameter für die Template-Vermehrung während der

exponentiellen Phase der PCR (Higuchi et al. 1992, Higuchi et al. 1993). Sie dient somit dem Nachweis eines bestimmten DNA-Abschnittes mit Mengenbestimmung und wird vielfach für die medizinische Diagnostik, Targetsuche oder Grundlagenforschung verwendet.

Für die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode wurde der Fluoreszenzfarbstoff im Super Array Green Super-Mix (Fa.Biorad) eingesetzt. Vor Beginn der Experimente wurde der „Super-Mix“ auf ca. 36 °C mittels Thermomixer comfort (Eppendorf) erwärmt und anschließend kurz zentrifugiert. Die verwendeten Primer sind in Tab. 6 zusammengefasst. Zur Gewährleistung eines qualitativ hochwertigen und reproduzierbaren Versuchsablaufs wurden folgende Reagenzien durch einen Pipettierautomaten CAS-1200 (Corbett Research, Wasserburg, D) zusammengefügt:

Primer-Mix (je Primer)

20,00 µl	Primer fw
20,00 µl	Primer rv
960,00 µl	RNase freies Wasser

Master-Mix

5,00 µl	Primer-Mix
10,00 µl	Super-Mix

Nun wurden die cDNA-Proben auf Eis aufgetaut. Pro Well einer 96-Well-Platte ergaben sich folgende Volumina der Reagenzien für die jeweiligen PCR-Ansätze:

15,00 µl	Master-Mix
<u>5,00 µl</u>	<u>cDNA-Probe</u>
20,00 µl	Gesamtvolumen

Alle PCR-Ansätze wurden automatisch in 0,1 ml Strip Tubes für Rotor-Gene (LTF-Labortechnik GmbH & Co.KG, Wasserburg, D) pipettiert und konnten hinterher unter ständiger passiver Blockkühlung in einem Thermocycler System Corbett Life Science-Rotor-Gene 6000 (Bosch, Sydney, Australien) für die anschließende qRT-PCR eingesetzt werden. Mit der gleichnamigen Software er-

folgten nun die Messungen und Auswertungen der cDNA-Expressionslevel mit einem etablierten „3 step-fast“-Temperaturprofil (Tab. 7).

Tab. 7 **PCR Protokoll für Corbett**

SCHRITT	ZYKLUS	DAUER	TEMPERATUR
Erste Denaturierung	1	10min	95 °C
Denaturierung	5	15sec	95 °C
Annealing		30sec	60 °C
Extension		30sec	72 °C
Denaturierung	35	1sec	90 °C
Annealing		10sec	60 °C
Komplettierung		20sec	72 °C
Schmelzen	0,5 °C	90sec	72 °C-95 °C

Durch die zweifache Erhitzung konnte sicher gegangen werden, dass sich sowohl die DNA-Doppelstränge als auch Primer vollständig voneinander getrennt haben. Von allen Proben wurde eine Dreifachbestimmung der Amplifikationsreaktionen durchgeführt sowie eine anschließende Schmelzkurvenanalyse des Amplifikats zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte. Die Schmelztemperatur ist dabei abhängig von der Größe und der Basensequenz des Amplifikats, sodass bei Vorliegen von nur einem PCR-Produkt (100% Spezifität) auch nur ein eindeutiger Peak in der Schmelzkurve auftritt (Ririe et al. 1997, Pietila et al. 2000, Lipsky et al. 2001). Um eine ausreichende Sensitivität zu erzielen, wurde der Parameter der Effizienz herangezogen. Nun konnte zwischen Zielprodukt und unspezifischer DNA differenziert werden.

3.5.6 Molekularbiologische Auswertung

Normierung und quantitative Analyse

Sämtliche Daten wurden auf den Mittelwert des Referenzgens – auch „house keeping gene“ genannt – scheinoperierter Schweine (Sham-Tiere, n=3) bezogen. Bei „keeping genes“ handelt es sich um Gene, die in jedem Gewebe in relativ gleichem Maße exprimiert werden und der Qualitätssicherung einer Positivkontrolle mit Primern dienen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als solches Gen β -Actin (*ACTB*) gewählt.

Die relative Genexpressionsrate eines Zielgens (target) wurde auf der Basis der Amplifikationseffizienz (E) und der Threshold-Cycle-Differenz (ΔCP) einer Probe

versus der Kontrolle (Sham-Tier) nach der folgend aufgeführten Formel berechnet.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}$$

Abb. 5 **Formel nach Pfaffl** (Pfaffl 2001)

Die Effizienz wird bestimmt, indem die CP-Werte („Crossing Point“) gegen den Logarithmus der Startkonzentrationen aufgetragen werden. Mittels logarithmischer Regression wird die Regressionsgerade berechnet, aus deren Anstieg sich die Effizienz ergibt.

Daraufhin wurden die Ratios zur Basis 2 logarithmiert. So konnte der arithmetische Mittelwert der Proben und der Standardfehler des Mittelwertes (STABW) berechnet werden. Gene wurden als differenziell reguliert angesehen, die eine Hoch- bzw. Herunterregulierung um mehr als den Faktor 2 aufwiesen. Nun konnten die Zusammenhänge linear abgebildet werden.

4 ERGEBNISSE

Zur Überprüfung der Relevanz von Entzündung und Zelltod in der Niere septischer Versuchstiere infolge persistierender Behandlung mit verschiedenen VEL, wurden diese auf den verschiedenen Ebenen der Histopathologie und Genexpression betrachtet.

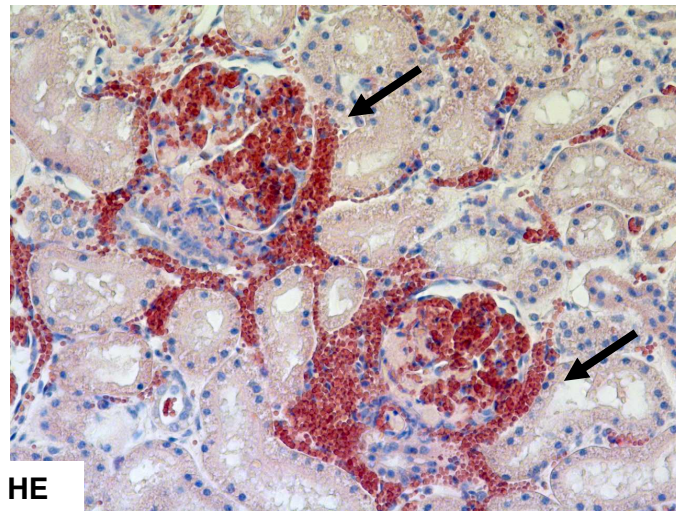
Bei allen folgenden histologischen Auswertungen wurde besonderes Augenmerk auf die Strukturen der Glomeruli und den Tubuli-interstitiellen Raum der Niere gelegt, um zwischen Insult bedingten histopathologischen Veränderungen, insbesondere in verschiedenen Kompartimenten wie Nierenrinde, Nierenmark, Tubuläres System und bindegewebigen „Straßen“ mit Gefäßen und Nerven (Interstitium) unterscheiden zu können.

4.1 Immunhistologische Ergebnisse

4.1.1 HE-Färbung

Im Rahmen der HE-Färbung konnten bei den histologischen Nierenschnitten suffiziente Zeichen des akuten Nierenversagens bei allen Präparaten der septischen Versuchstiere *versus* der Sham-Tiere festgestellt werden. Darüber hinaus konnten sowohl in den Glomeruli als auch im Tubuli-interstitiellen Raum Einblutungen (Abb. 6) und Tubulusepithelschäden unterschiedlicher Ausprägungen festgestellt werden, die jedoch mittels HE-Färbung nicht näher differenzierbar waren. Im Folgenden wurden daher Methoden zur detaillierten und möglicherweise quantitativen Beschreibung des Ausmaßes der Nierenschädigung angestrebt. Da jedoch auch mithilfe eines erfahrenen Nephropathologen keine Einteilung der Gewebeschädigung nach einem Scoring-System möglich war, wurde die vorliegende Forschungsarbeit um Spezialfärbungen erweitert, die letztendlich eine statistische Auswertung ermöglichen.

Sepsis



HE

Abb. 6 Übersichtsdarstellung von Nephronen.
Darstellung einer massiven Einblutung in die
Glomeruli und den Tubuli-interstitiellen Raum.
HE-Färbung, 20x Vergrößerung: Sy 48, 10% HES
200

4.1.2 Esterase-Färbung

Histologische Befunde der Esterase-Färbung

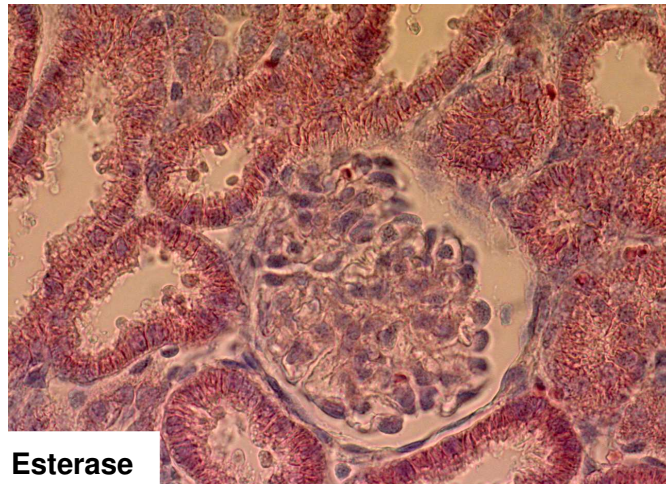
Esterase ist sowohl in Knochenmarkstammzellen als auch in eosinophilen Granulozyten, Monozyten, Plasmazellen, Megakaryozyten, Erythrozyten, Histiozyten und Makrophagen aktiv. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur große rundovale Zellen mit sichtbaren Granula als Esterase-positive PMN bewertet. Diese PMN fungieren als Phagozyten des angeborenen Immunsystems und werden auch als Neutrophile bezeichnet, da sich ihre Granula im Zytoplasma nicht mit HE anfärben lassen (Mims 2006). Die Anzahl der eingewanderten Zellen im Gewebe stellt ein gebräuchliches Maß zur Abschätzung des Entzündungsgrades dar (Gee 1984). Ausgangspunkt der Untersuchung war die Frage nach dem Entzündungsausmaß in den Glomeruli sowie im Tubuli-interstitiellen Raum infolge der Verabreichung verschiedener VEL in septischen Versuchstieren.

Die histologische Auswertung mithilfe der Esterase-Färbung zeigte in allen septischen Versuchstieren im Vergleich zu den nicht exponierten Tieren eine erhöhte Dichte Neutrophiler. Auffällig war, dass die PMN sich vorwiegend in den Glomeruli und dort vor allem im viszeralem Blatt der Bowman-Kapsel ansammelten, was auf eine beträchtliche Entzündung des Endothels, der Basallamina und der Podozyten hinweist.

Als Positivkontrolle wurde das mit Leucognost® NASDCL gefärbte Knochenmark eines septischen Versuchstieres gewählt, da dort die Bildung der Granulozyten stattfindet.

Sham

A Esterase



Sepsis

B Esterase

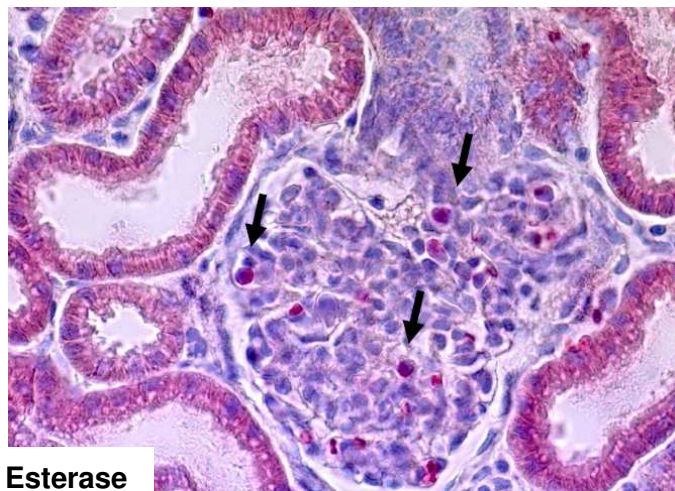


Abb. 7 Abschätzung des Entzündungsmaßes durch eingewanderte PMN-Zellen. (A) Sham-Niere ohne sichtbare Entzündungszellen. (B) PMN im visceralen Blatt des Glomerulum. Als deutlich pinkfarbene und gut auszählbare Partikel von umliegendem Gewebe und Zellen unterscheidbar (Pfeil).

Esterase-Färbung, 40x Vergrößerung: (B) Sy 58, Ringer-Azetat

Statistische Auswertung der Esterase-Färbung

Tab. 8 gibt einen Überblick über die unterschiedlich therapierten Versuchstiere und deren Anzahl Esterase-positiver Zellen in den verschiedenen Bereichen der Niere. Im Rahmen der Untersuchung ist auch bei den Kontrolltieren ein geringes Aufkommen von PMN identifiziert worden, was als Resultat der Operation bedingten Stress-Situation als plausibel anzusehen ist.

Tab. 8 Anzahl Esterase-positiver Zellen in den verschiedenen Kompartimenten

Gruppen	Anzahl Tiere	Glomeruli		Tubuli-interstitiell	
		Median (Zellzahl/40 GF)	IQB	Median (Zellzahl/40 GF)	IQB
Sham	3	64,3	31,5	3,8	0,3
Sepsis + HES 130	5	100,3	92,5	9,3	5,2
Sepsis + HES 200	5	178,0	65,6	11,4	2,15
Sepsis + Gelatine	5	109	90,5	5,9	5,0
Sepsis + Ringer	5	84,8	39,6	6,4	7,6

Aus der Anzahl Esterase-positiver Zellen pro Gesichtsfeld (GF) beider Nieren eines Tieres wurde der Median sowie der Interquartilbereich (IQB) pro Gruppe errechnet. Das Entzündungsausmaß ist in den verschiedenen Kompartimenten Glomeruli und Tubuli-interstitieller Raum dargestellt.

Im Rahmen der Untersuchung von Entzündungsprozessen in der septischen Niere konnte eine Zentrierung in die Glomeruli festgestellt werden. Die Auswertung der mit Esterase gefärbten Nierenschnitte zeigte in der unstimulierten Kontrollgruppe einen Zentralwert von 64,3 in den Glomeruli. Alle anderen Gruppen, die sowohl einen hämorrhagischen als auch septischen Schock erlitten, wiesen eine höhere Anzahl an Entzündungszellen auf. Gegenüber der Sham-Gruppe stellte sich bei den Versuchstieren, die mit 10% HES 200 (178,0) therapiert wurden, eine dreifache Erhöhung an Entzündungszellen in beiden Kompartimenten dar. Versuchstiere, die 6% HES 130 (100,3) oder 4% Gelatine erhielten, zeigten im Vergleich ein ähnliches Korrelat an entzündlichen Veränderungen.

Der Kruskal-Wallis-Test (Tab. 9, Datenanhang) ergab signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen VEL in Bezug zur Anzahl an Entzündungszellen in den verschiedenen Kompartimenten der Niere. Mittels Mann-Whitney-U-Test konnte dargestellt werden, zwischen welchen VEL dieser Unterschied besteht (Tab. 10 und Tab. 11, Datenanhang). Dessen Ergebnisse, bezogen auf das gesamte Nierengewebe, sind im Folgenden graphisch dargestellt worden (Abb. 8).

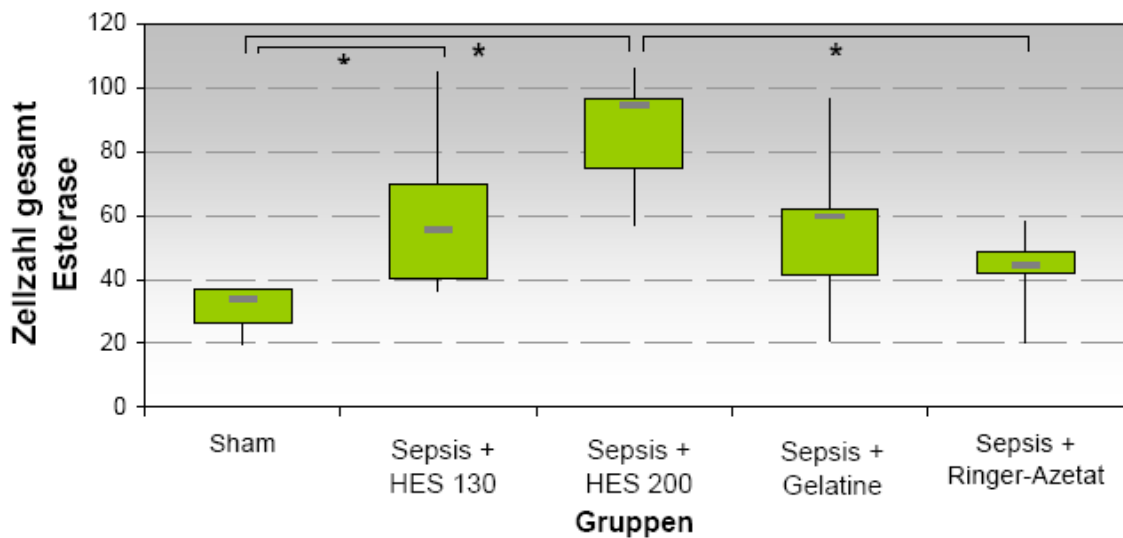


Abb. 8 Graphisch dargestellt sind als Boxplot jeweils Median, 25%- und 75%-Quantil sowie Minimal- und Maximalwert. Mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Volumengruppen (Sham, 6% HES 130, 10% HES 200, 4% Gelatine und Ringer-Azetat) im gesamten Nierengewebe geprüft. Signifikante Unterschiede gegenüber den Sham-Tieren und innerhalb der Subgruppen sind durch das Zeichen * angezeigt ($p \leq 0,05$).

Im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren zeigte sich sowohl für die septischen Versuchstiere die 6% HES 130 als auch für die 10% HES 200 Tiere eine signifikant höhere Anzahl an Entzündungszellen im gesamten Nierengewebe, also in den Glomeruli als auch in den Tubuli-interstitiellen Bereichen. Betrachtet man die verschiedenen Nierenkompartimente isoliert (Tab. 10 und 11), stellen sich unter der Therapie mit 6% HES 130 keine signifikanten Entzündungszeichen in den Glomeruli dar, währenddessen 10% HES 200 in beiden Kompartimenten eine signifikante Einwanderung von Entzündungszellen im Vergleich zur Sham-Gruppe zeigte. Die Anzahl an Entzündungszellen in beiden Kompartimenten der Gruppe 10% HES 200 unterschied sich insofern von der der Sepsis + Ringer-Azetat-Tiere, als das sich in der letztgenannten Gruppe eine signifikant niedrigere Anzahl an Entzündungszellen darstellen ließ. Im Tubuli-interstitiellen Raum konnte eine signifikant höhere Einwanderung an Entzündungszellen unter 10% HES 200 im Vergleich zu 4% Gelatine gezeigt werden.

4.1.3 TUNEL-Färbung

Histologische Befunde der TUNEL-Färbung

Mithilfe der TUNEL-Färbung konnte die Anwesenheit typischer DNA-Fragmente apoptotischer Zellen über Markierung der freien 3'-OH-Enden als braun eingefärbte Signale nachgewiesen werden.

So befanden sich TUNEL-positive Zellen im Interstitium zwischen den tubulären Zellen, im Tubulusepithel und innerhalb kleiner Gefäßlumen. Im gesamten Nierengewebe waren weniger TUNEL-positive Bereiche und insbesondere wesentlich weniger Apoptose in den Glomeruli nachweisbar, als es bei dem Nachweis der eingewanderten Entzündungszellen der Fall war.

Mehrfach fiel eine scharfe Abgrenzung TUNEL-positiver Prozesse vom umliegenden Nierengewebe auf, in dessen Umgebung scheinbar keine entzündlichen Prozesse abgelaufen sind (Abb. 9). Zellen in TUNEL-positiven Bereichen erschienen zuweilen losgelöst aus der basalen Membran.

Als Positivkontrolle wurde Gewebe eines Mamma-Karzinoms gewählt, bei dem aufgrund der Pathologie und der Präparation eine enorme Anzahl TUNEL-positiver Zellen gezeigt werden konnte.

Sepsis

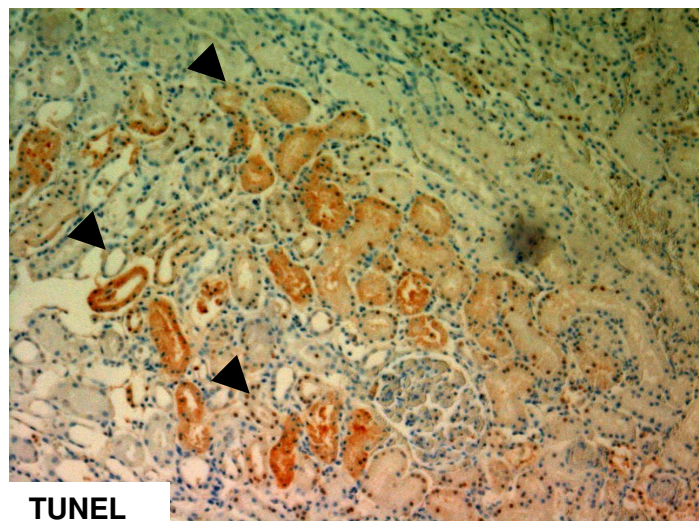


Abb. 9 Tubuli-interstitielle apoptotische Prozesse

Darstellung einer scharfen Abgrenzung TUNEL-positiver Prozesse im Tubuli-interstitiellen Raum (Pfeilspitze).

TUNEL-Färbung, 10x Vergrößerung: Sy 48, 10% HES 200

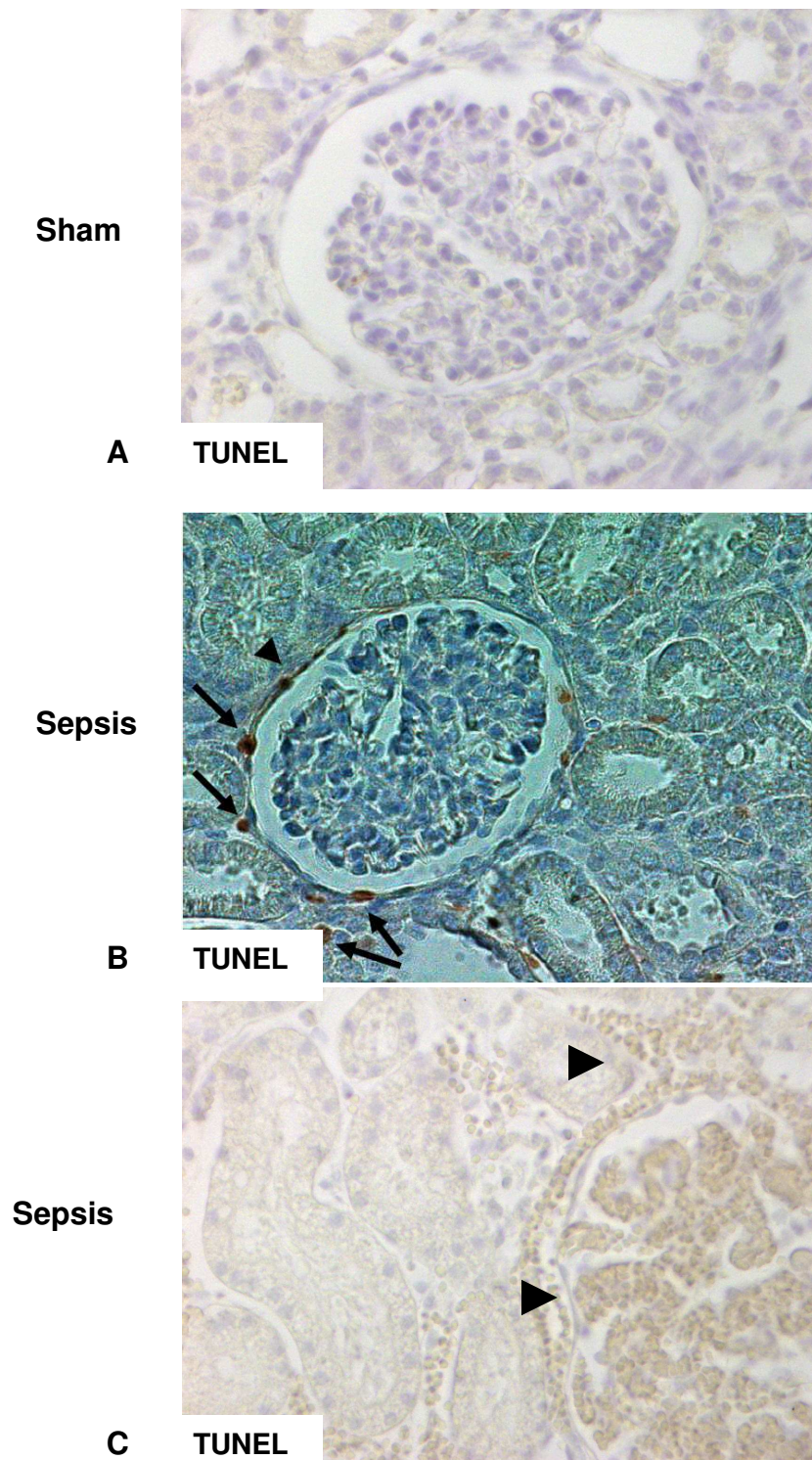


Abb. 10 Abschätzung des Zelltod-Ausmaßes durch TUNEL-positive Zellen (A) Glomerulum und Tubuli-interstitieller Raum ohne Zeichen von apoptotischen Zellen. (B) Abgeschwächtes Signal TUNEL positiver Zellen um das parietale Blatt der Bowman-Kapsel herum (Pfeil). (C) Beträchtliche Bildung apoptotischer Zellen sowohl im Glomerulum als auch im Interstitium (Pfeilspitze). TUNEL-Färbung, 40x Vergrößerung: (B) Sy 40, Ringer-Azetat; (C) Sy 48, 10% HES 200

Statistische Auswertung der TUNEL-Färbung

Tab. 12 gibt einen Überblick unterschiedlich therapierter Tiere und deren Anzahl TUNEL-positiver Zellen in den verschiedenen Bereichen der Niere. Die Anzahl apoptotischer Zellen in den Kontrolltieren stehen im Einklang mit physiologisch stets vorhandener Spontanapoptose.

Tab. 12 Anzahl TUNEL-positiver Zellen in den verschiedenen Kompartimenten

Gruppen	Anzahl Tiere	Glomeruli		Tubuli-interstitiell	
		Median (Zellzahl/40 GF)	IQB	Median (Zellzahl/40 GF)	IQB
Sham	3	0,1	0,4	1,6	1,7
Sepsis + HES 130	5	0,2	0,9	10,2	34,3
Sepsis + HES 200	5	0,65	2,5	27,0	63,8
Sepsis + Gelatine	5	0,4	1,1	15,8	37,2
Sepsis + Ringer	5	0,1	0,4	10,4	19,7

Aus der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Gesichtsfeld (GF) beider Nieren eines Tieres wurde der Median sowie der Interquartilbereich (IQB) pro Gruppe errechnet. Das Apoptoseausmaß ist in den verschiedenen Kompartimenten Glomeruli und Tubuli-interstitieller Raum dargestellt.

Insgesamt zeigt sich eine geringe Apoptoserate in den Nieren der behandelten Versuchstiere, wobei die apoptotischen Schädigungen vorwiegend im Tubuli-interstitiellen Raum sichtbar sind. In den vier Gruppen, in denen eine Sepsis induziert worden ist, stellten die 10% HES 200 therapierten Tiere (27,0) vor der 4% Gelatine-Gruppe (15,8) den höchsten Anteil TUNEL positiver DNA-Fragmente dar. Die Ringer-Azetat-Gruppe (10,4) und 6% HES 130-Gruppe (10,2) zeigten seltener anzutreffende TUNEL-positive Zellen im Tubuli-interstitiellen Kompartiment.

Der Kruskal-Wallis-Test (Tab. 13, Datenanhang) ergab lediglich im Tubuli-interstitiellen Raum signifikante Unterschiede unter den Gruppen (Tab. 14, Datenanhang) sowie im gesamten Nierenbereich. Daher konnte der Bereich der Glomeruli bei dem anschließenden Mann-Whitney-U-Test außen vorgelassen werden. Die Ergebnisse, bezogen auf das gesamte Nierengewebe, sind im Folgenden graphisch dargestellt worden (Abb. 11).

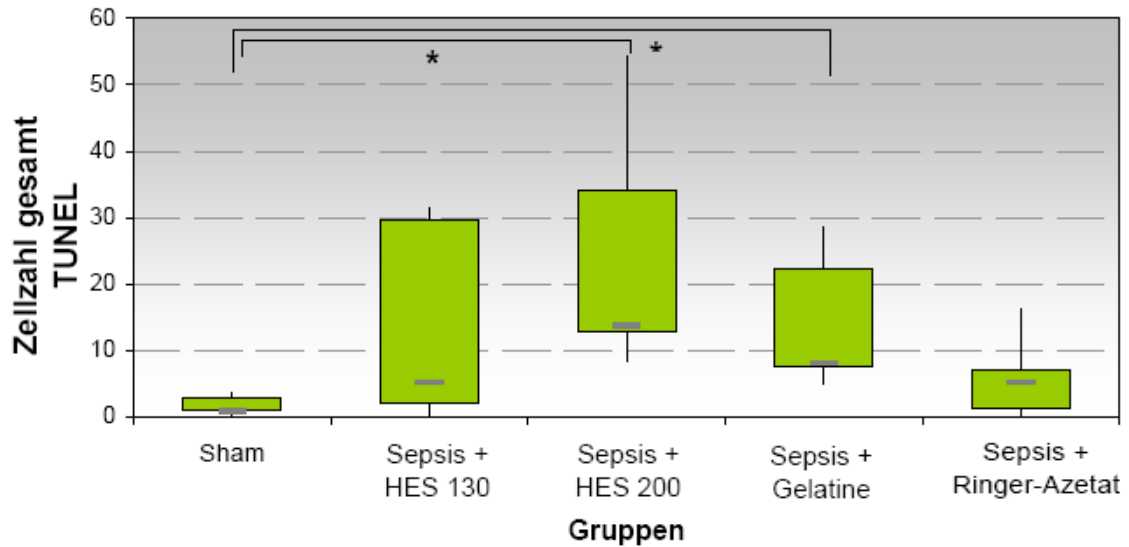


Abb. 11 Graphisch dargestellt sind als Boxplot jeweils Median, 25%- und 75%-Quantil sowie Minimal- und Maximalwert. Mithilfe des Mann-Whitney-*U*-Tests wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Volumengruppen (Sham, 6% HES 130, 10% HES 200, 4% Gelatine und Ringer-Azetat) im gesamten Nierengewebe geprüft. Signifikante Unterschiede gegenüber den Sham-Tieren und innerhalb der Subgruppen sind durch das Zeichen * angezeigt ($p \leq 0,05$).

Im Vergleich zu den Sham-Tieren war ein signifikant erhöhter Tubuli-interstitieller Zellschaden bei den septischen Tieren aus der 10% HES 200 sowie der 4% Gelatine-Gruppe zu verzeichnen. In Gegenüberstellung der Subgruppen zeigten sich Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen unter den 10% HES 200 Tieren im Vergleich mit den Ringer-Azetat-Tieren, die jedoch nicht signifikant waren. Die Unterschiede zwischen den Gruppen 10% HES 200 und 6% HES 130 waren statistisch nicht signifikant. Das Maximum aller ausgezählten fragmentierten Zellkerne im untersuchten Nierengewebe lag nach 10% HES 200-Applikation (54,2) vor.

4.1.4 Jones-Färbung und Lektinbindung

In der Versilberung nach Jones färben sich die Proteine des tubulären Bürstensaumes sowie der tubulären und glomerulären Basalmembran schwarz. Dadurch lassen sich Veränderungen der Nierenarchitektur wie Gewebeerstörung (Destruktion) des tubulären Bürstensaumes, Veränderungen der zellulären Integrität der Tubulusepithelzellen oder Störungen der glomerulären Architektur darstellen.

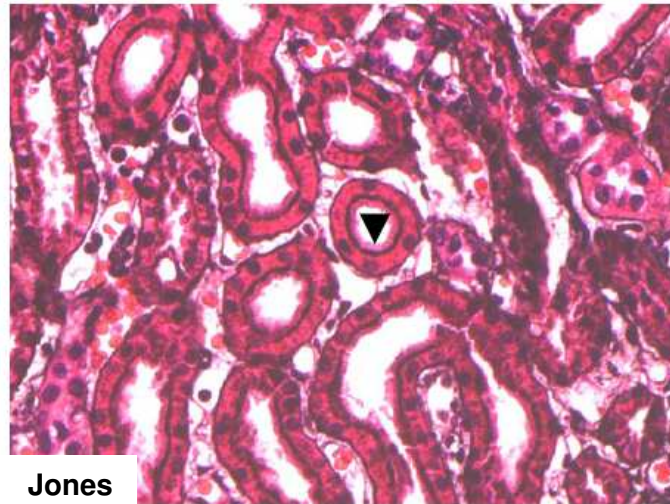
Im Unterschied zu den Sham-Tieren ließ sich in den septischen Tieren vermehrt Gewebeschwund (Rarefizierung) und Destruktion des Bürstensaumes nachweisen sowie Kontinuitätsunterbrechungen der tubulären Basalmembran als Zeichen des akuten Tubulusepithelschadens (Abb. 12).

Mit den bereits durchgeführten HE- und Jones-Färbungen konnte rein visuell ein Tubulusepithelschaden als morphologisches Kriterium für ANV bei allen septischen Versuchstieren ausgemacht werden. Jedoch sollte eine semiquantitative Methode zur Untersuchung der bestimmten Nierenstrukturen darüber Auskunft geben, unter welcher VEL dieser Tubulusepithelschaden in der Niere am deutlichsten auftritt.

Ergänzend wurde daher durch Lektinbindung die Quantifizierung des Tubulusepithelschadens und der Bürstensaum speziell abgebildet (Abb. 13 und 14), wobei eine repräsentative Darstellung unterschiedlicher Stadien des akuten Tubulusepithelschadens anhand der Anlagerung von PHA-E an Glykoproteine eines intakten Bürstensaumes gelang.

In Abb. 13 ist deutlich zu erkennen, dass im Falle einer Sepsis der Bürstensaum im Tubulusepithel der Niere wesentlich geringer ausgeprägt und somit unzureichend intakt ist.

Sham



Sepsis

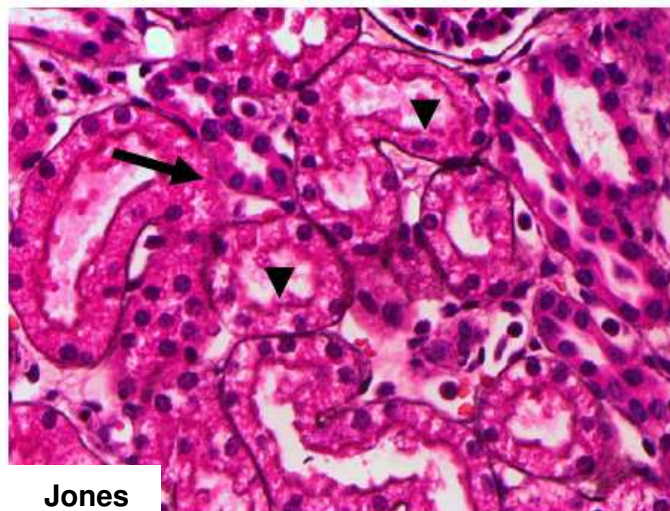
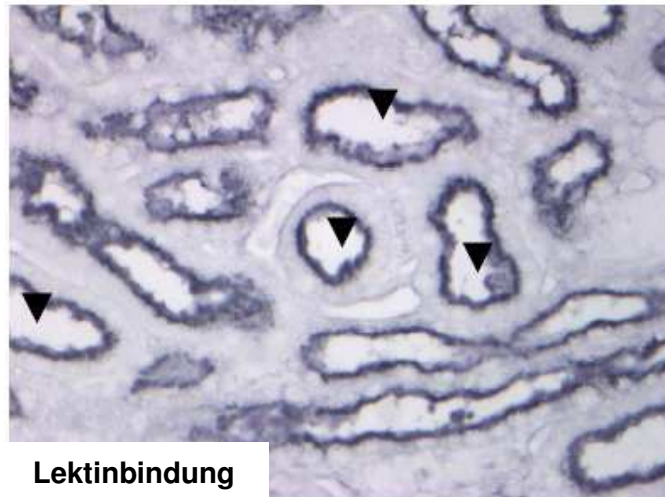


Abb. 12 Integrität des Bürstensaumes tubulärer Epithelzellen. (A) Sham-Niere mit intaktem Bürstensaum der Tubulusepithelzellen (Pfeilspitze). (B) Destruktion/Rarefizierung des Bürstensaumes (Pfeilspitze) und Kontinuitätsunterbrechungen der tubulären Basalmembran (Pfeil) als Zeichen des akuten Tubulusepithelschadens.

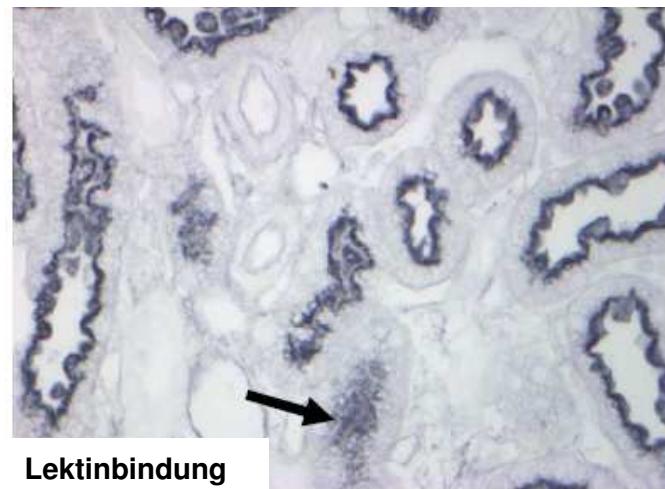
Jones-Färbung, 400x Vergrößerung: (B) Sy 50, 10% HES 200

Sham



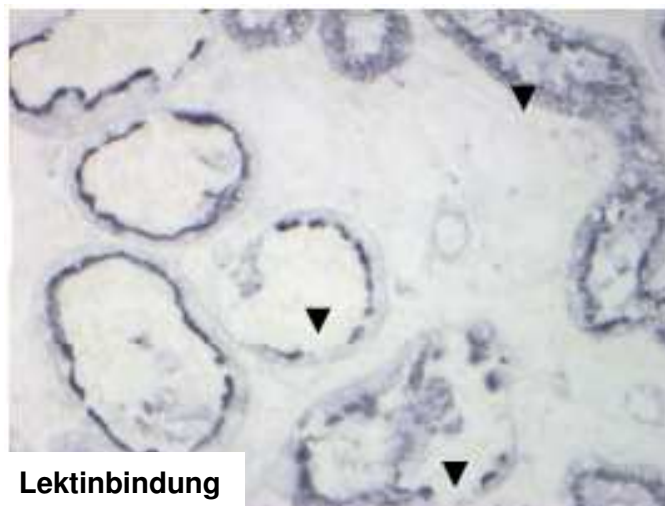
A Lektinbindung

Sepsis



B Lektinbindung

Sepsis



C Lektinbindung

Abb. 13 Integrität des Bürstensaumes tubulärer Epithelzellen (A) Tubuli der Sham-Niere mit intaktem Bürstensaum ergeben ein durchgehendes und dichtes schwarzes Signal (Pfeilspitze). (B) Abgeschwächtes Signal eines destruierten Bürstensaumes der Tubulusepithelzellen (Pfeil). (C) Hochgradige Destruktion des Bürstensaumes der Tubulusepithelzellen (Pfeilspitze).
Lektinbindung, 40x Vergrößerung: (B) Sy 63 und (C) Sy 48, beide 10% HES 200

Semiquantitative Auswertung

Abb. 14 gibt einen Überblick über die unterschiedlich therapierten Schweine und deren Nieren, die positive Signale durch gebundenes PHA-E (Pixel Count) als Zeichen intakter Tubulusepithelzellen aufweisen konnten.

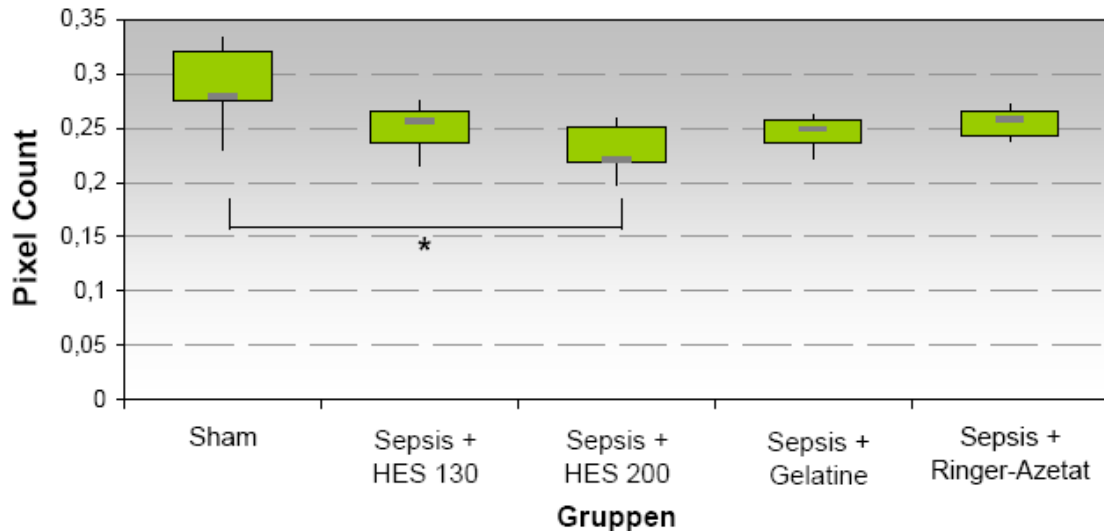


Abb. 14 Graphisch dargestellt sind als Boxplot jeweils Median, 25%- und 75%-Quantil sowie Minimal- und Maximalwert. Mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (Tab. 15, Datenanhang) wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Volumengruppen (Sham, 6% HES 130, 10% HES 200, 4% Gelatine und Ringer-Azetat) im gesamten Nierengewebe geprüft. Signifikante Unterschiede gegenüber den Sham-Tieren und innerhalb der Subgruppen sind durch das Zeichen * angezeigt ($p \leq 0,05$).

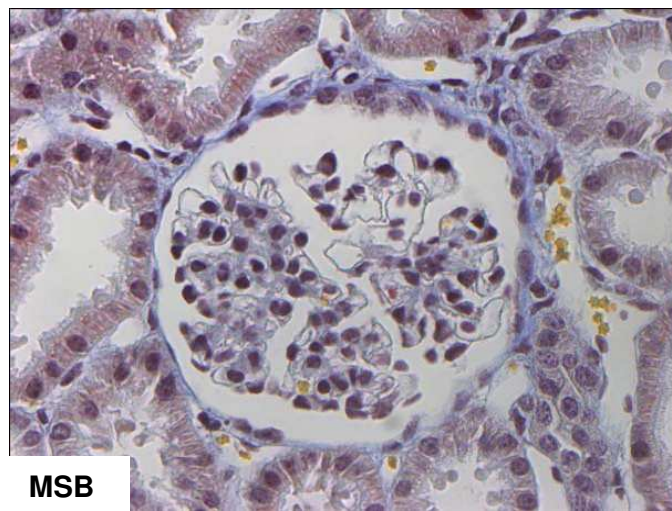
Anhand der semiquantitativen Auswertung des Tubulusepithelschadens zeigte sich ein Unterschied innerhalb der einzelnen Subgruppen. In der 10% HES 200-Gruppe (0,22) fand sich, im Vergleich zur Sham-Gruppe (0,28), ein signifikant reduziertes Bindungsverhalten des PHA-E an die Tubulusepithelien, was bezeichnend für einen massiven Tubulusepithelschaden ist. Die Sepsis induzierten Versuchstiere der Gruppen 6% HES 130 (0,25), 4% Gelatine (0,24) und Ringer-Azetat (0,25) zeigten untereinander vergleichbar hohe positive Signale, dementsprechend weniger Tubulusepithelschaden.

4.1.5 MSB-Färbung

Zur weiteren Charakterisierung der thrombotischen Mikroangiopathie wurde die MSB-Färbung angewandt, wobei hier das Fibrin rot, die Erythrozyten gelb und kollagene Fasern blau angefärbt wurden. Als morphologisch wesentliche Kriterien einer thrombotischen Mikroangiopathie fanden sich in drei (Sy 48, Sy 50, Sy 54, alle 10% HES 200) der untersuchten 23 Schweinenieren glomeruläre fibrinreiche Mikrothromben sowie in vier Versuchstieren (Sy 48 10% HES 200, Sy 52 und Sy 62 beide 6% HES 130, Sy 58 Ringer-Azetat) fibrinreiche Thromben in hilusnahen Arteriolen.

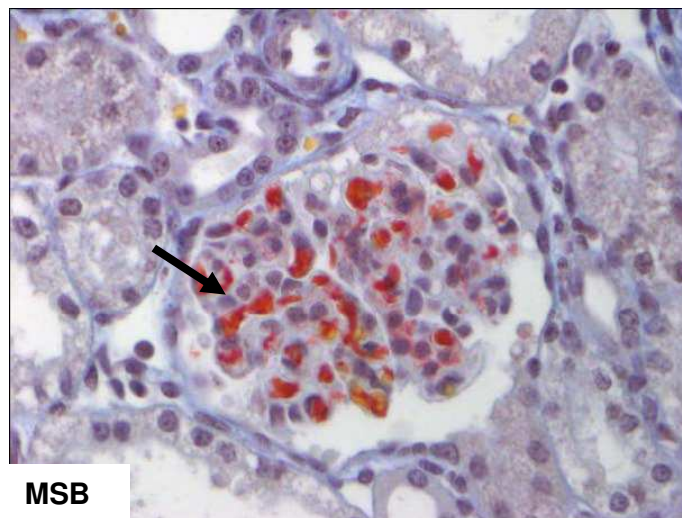
Sham

A MSB

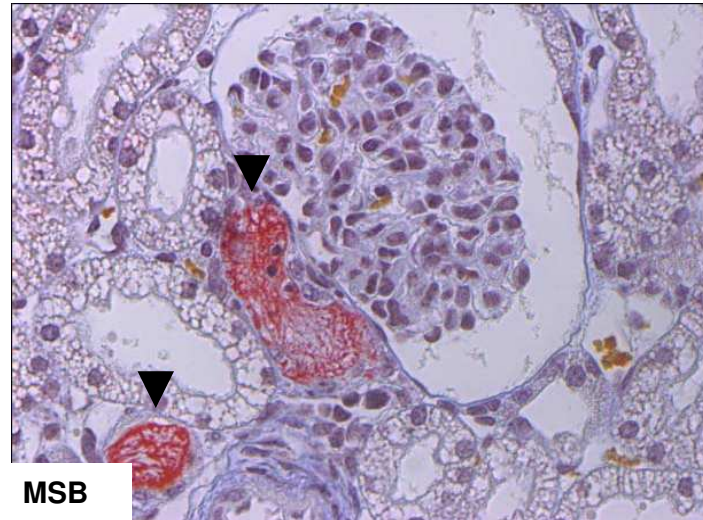


Sepsis

B MSB



Sepsis



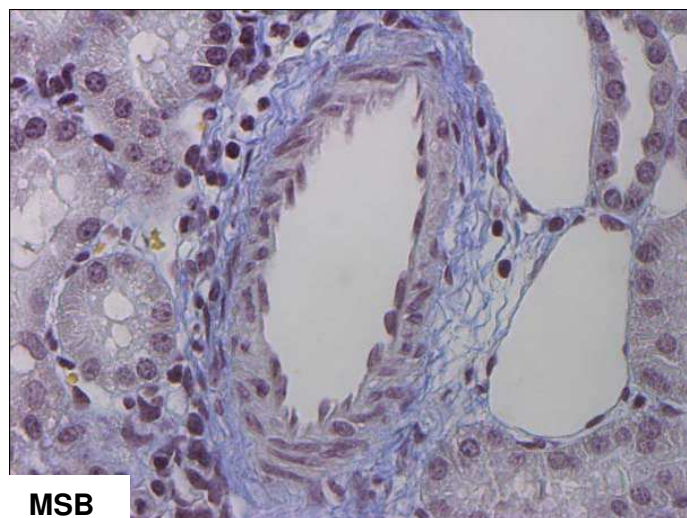
C MSB

Abb. 15 Fibrinreiche Bereiche in der Niere. (A) Sham-Tier mit intaktem glomerulären und tubulären Apparat. (B) Glomeruläre fibrinreiche Mikrothromben (Pfeil). (C) Fibrinreicher Thrombus in hilusnaher Arteriole (Pfeilspitze) als typisches Zeichen einer thrombotischen Mikroangiopathie in der septischen Schweineniere.

MSB-Färbung, 400x Vergrößerung: (B) Sy 50, 10% HES 200 und (C) Sy 52, 6% HES 130

Weiterhin zeigte sich bei einem Versuchstier (Sy 48, 10% HES 200) eine globale fibrinoide Nekrose der Arteriolen als seltene arterioläre Läsion, wie sie u.a. bei einer thrombotischen Mikroangiopathie auftreten kann.

Sham



A MSB

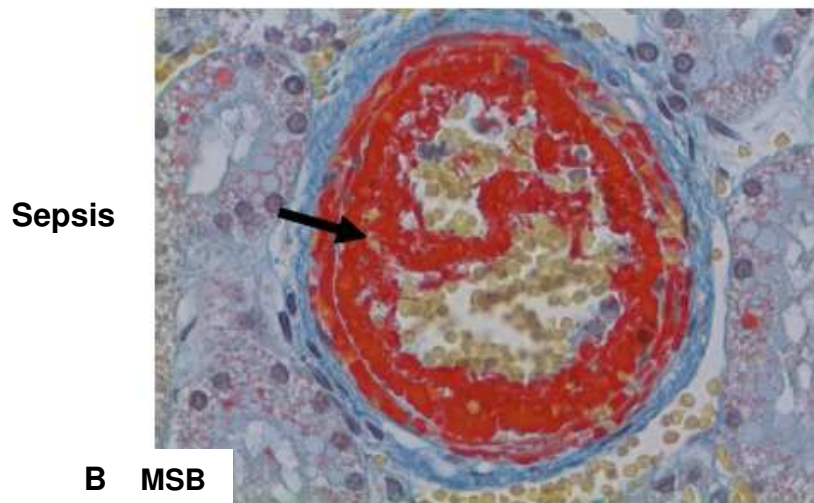


Abb. 16 Integrität einer Arteriole. (A) Intakte Arteriole eines Sham-Tieres. (B) Fibrinoide Wandnekrose der Arteriole als seltenes Zeichen einer thrombotischen Mikroangiopathie in der septischen Schweineniere (Pfeil).
MSB-Färbung, 400x Vergrößerung: (B) Sy 48, 10% HES 200

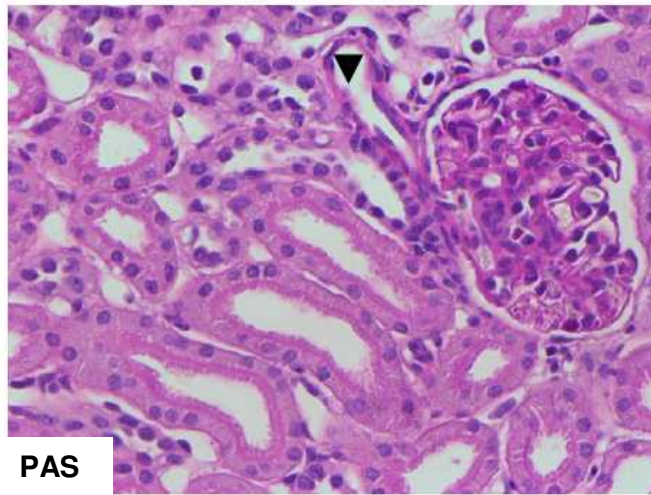
4.1.6 PAS-Färbung

In allen septischen Schweinenieren zeigten sich anhand der PAS-Färbung unterschiedliche Stadien des akuten Tubulusepithelschadens als Zeichen beginnender Nekrosen der Tubulusepithelien. Als weitere Folge der intravenösen Gabe verschiedener Infusionslösungen stellte sich eine fein vakuoläre Umwandlung des Tubulusepithels und Vakuolenbildung im Zytoplasma (sogenannte osmotische Nephrose) dar, die durch eine pinozytäre Rückresorption hochmolekularer Substanzen zustande kommen. Diese Substanzen werden in Phagolysosomen zurückgehalten und enzymatisch abgebaut. Die Spaltprodukte und der wässrige Vakuoleninhalt gelangen dann allmählich in das Zytoplasma und von dort zum Teil in das Niereninterstitium.

Demgegenüber konnten anhand der PAS-Färbung chronische Erkrankungen der Gefäßwand von Arteriolen und Arterien ausgeschlossen werden.

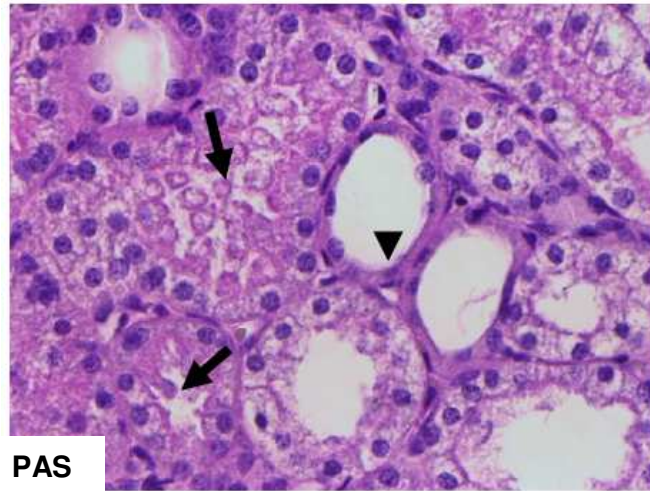
Sham

A PAS



Sepsis

B PAS



Sepsis

C PAS

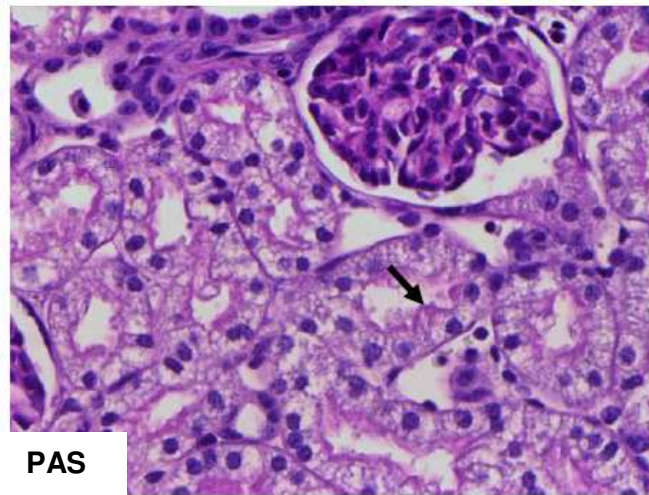


Abb. 17 Integrität glykogenreicher Zellen.

(A) Sham-Niere mit intakten Tubuli, Glomeruli und hilusnaher Arteriole (Pfeilspitze). (B) Frühe Zeichen des akuten Tubulusepithelschadens mit Vesikelbildung (Pfeil) und Abflachung der proximalen Tubulusepithelzellen sowie Ausweitung des Tubuluslumens (Pfeilspitze). (C) Osmotische Nephrose mit feingranulärer diffuser Umwandlung des Zytoplasmas sowie Ballonierung der Tubulusepithelzellen (Pfeil). PAS-Färbung, 400x Vergrößerung: (B) Sy 51, 4% Gelatine und (C) Sy 50, 10% HES 200

4.2 Molekularbiologische Ergebnisse

Um auf molekularer Ebene zu analysieren, welchen Einfluss Sepsis auf die Expression von inflammatorischen Zytokinen und Apoptose nachweisenden Markern in der Niere hat, wurden Gewebeproben der Nieren septischer Versuchstiere zur Untersuchung herangezogen. Diese wurden im Vorfeld mit unterschiedlichen VEL behandelt. Zur Untersuchung der pathogenen Mechanismen während einer Sepsis wurden fünf relevante Gene (Tab. 16) mittels quantitativer RT-PCR getestet.

Tab. 16 **Definition der sepsisrelevanten Gene**

Symbol	Bezeichnung	Prominente Funktionen
P53	Protein 53	Tumorsuppressor-Protein; Regulator der Apoptose-induktion (Takahashi 1996, Gomez-Lazaro 2004)
IL6	Interleukin-6	Zytokin; proinflammatorische Effekte (Lv 2006, Stengl 2008)
TNF α	Tumornekrosefaktor α	Zytokin; Effekte auf Entzündung und Apoptose (Lv 2006, Yang 2005)
CASP3	cysteine aspartate-specific proteases	Effektor-Caspase; Hydrolase; Enzym der Apoptose (Matsuda 2007)
C/EBP- β	CAAT/enhancer binding protein β	humaner Transkriptionsfaktor; sowohl an Inflammation als auch an Apoptose beteiligt (Slofstra 2007)

Zur Erzielung einer ausreichenden Sensitivität und zur exakten Berechnung, der für dieses experimentelle Setting übliche Auswertung-Algorithmus nach „Pfaffl“, wurde als Kriterium ein Effizienz-Mittelwert von $< 65\%$ und CP-Werte („Crossing Point“) in Bereichen gewählt, die bei der Dreifachbestimmung der Probe lediglich Schwankungen zeigten. Durch zu große Abweichungen in diesen Bereichen wurde beim paarweisen Vergleich der Sepsis + Ringer-Azetat-Gruppe eine Niere ausgeschlossen. Die logarithmierten Daten der quantitativen RT-PCR sowie der STABW der Mittelwerte sind im Datenanhang (Tab. 17) und graphisch in Abb. 18 dargestellt. Sie stellen die Mittelwerte aus den Ratios der einzelnen Nieren dar und präsentieren damit deren Genexpression. Das Basistranskriptionslevel wird durch 0 auf der y-Achse repräsentiert. Somit entspricht der Wert 1 bzw. -1 auf der y-Achse einer Verdopplung bzw. Halbierung der Genexpression, wobei ein Wert 2 bzw. -2 bereits einem Anstieg auf das Vierfache bzw. einer Reduzierung auf $\frac{1}{4}$ der Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle entspricht.

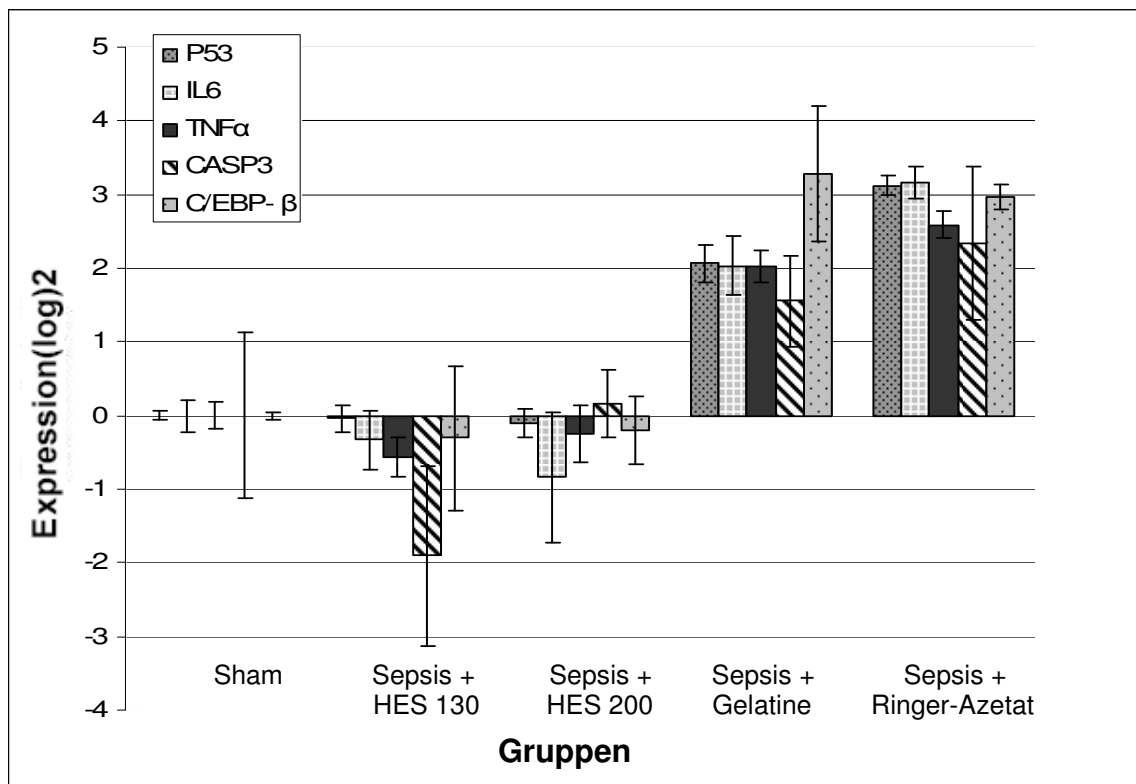


Abb. 18 Die **Expression der einzelnen Gene** wurde auf den Mittelwert des Referenzgens β -ACTB bezogen und nach Pfaffl ausgewertet. Nach Logarithmieren der Ratios wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (STABW) errechnet

Abb. 18 kann man entnehmen, dass Volumentherapie mit kolloidalen HES-Lösungen bei Versuchstieren im Rahmen einer Sepsis sowohl zu einer Hemmung der Transkription proinflammatorischer Gene als auch apoptotischer Gene führt. Eine Ausnahme bildet die zum Zelltod einleitende CASP3, die durch 10% HES 200 Infusionen schwach induziert ist, dafür unter Vernachlässigung des STABW unter einer 6% HES 130 Therapie stark reprimiert scheint. Da es bei den HES-Tieren jedoch zu keiner Herunterregulierung um den Faktor 2 kam, kann man bei den Ergebnissen nicht von einer signifikanten differenziellen Regulierung der einzelnen Gene im Beobachtungszeitraum ausgehen. Gegenüber der Sham-Gruppe ergab sich jedoch bei den septischen Versuchstieren, die mit 4% Gelatine und Ringer-Azetat-Lösung therapiert wurden, ein Einfluss auf die Genexpression aller in Tab. 16 aufgelisteten Gene. Der größte Effekt aller in dieser Arbeit untersuchten proinflammatorischen und apoptotischen Gene, ist bei den an Sepsis erkrankten Tieren zu messen, die Ringer-Azetat-Lösung erhielten. Hier steigt die Expression, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, auf das ca. 5x an. C/EBP- β scheint besonders durch die Infusion mit Gelatine bei dem kranken Nierengewebe hochreguliert zu sein.

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Versuchsaufbau

Die meisten derzeit verwendeten Tier-Sepsismodelle sind nur eingeschränkt übertragbar auf die klinische Situation und haben daher eine begrenzte Eignung für die Untersuchung von pathophysiologischen Mechanismen oder die Überprüfung des therapeutischen Nutzens eingesetzter Präparate (Fink 2008). Die Bedeutung der vorliegenden Studie hing daher von der Anwendbarkeit eines reproduzierbaren und klinisch repräsentativen Tiermodells ab, in dem Größen wie Keim-Spezies, Anzahl an Bakterien und Infektionsort bekannt sind. Die Variation von nur einer Messgröße, wie der Therapie, trägt zur Vereinfachung des Modells bei.

Ziel ist es, durch einen traumatischen Krankheitszustand, gleichsam eines hämorrhagischen Schocks („first hit“) sowie eines nachfolgenden Reizes durch *E. coli*-Peritonitis mit anschließendem septischen Schock („second hit“) gravierende entzündliche und apoptotische Prozesse herzuleiten. Es wird vermutet, dass durch „priming“ mit einem Mediator, wie z.B. $\text{TNF}\alpha$, die Reaktivität der PMNs dahingehend geändert wird, dass ein zweiter „priming“-Mediator eine PMN Aktivierung und folglich eine endotheliale Zellschädigung begründet (Condliffe et al. 1998, Weyman 2002). „Second hits“ mit verlängerter Infektionszeit führen zudem zu einem besseren Verständnis der Mechanismen der Immun-Dysregulation in der Sepsis (Weiss et al. 2007) und tragen dazu bei, langfristige und verzögerte Veränderungen zu erkennen sowie auf molekularer Ebene zu beschreiben. Demzufolge spielen diese für die Therapie und Prognose der Patienten eine entscheidende Rolle (Muenzer et al. 2006, Weiss et al. 2007).

Die Verursachung der Sepsis mittels bakterieller Peritonitis gilt als Vorteil des Modells. Experimente zeigten, dass es bei Sepsisauslösung durch Endotoxämie infolge lokaler Lipopolysaccharid (LPS)-Injektion Unterschiede in der Wirkung auf z.B. Fas-Liganden oder TNF-Rezeptoren gegenüber einer Sepsisauslösung durch bakterielle Peritonitis gab (Heumann et al. 1995). Zudem wurde von unterschiedlicher Sensitivität von z.B. Zytokinen gegenüber Endotoxämie *versus* Peritonitis berichtet (Echtenacher et al. 2001). Dazu ist die

Peritonitis mit 71% der häufigste Verursacher einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks während des klinischen Aufenthaltes von Patienten (Weiss et al. 2007). In 30-80% der Fälle sind gram-negative Bakterien wie *E. coli* der Auslöser eines solchen Reizes (Souza-Offtermatt et al. 2004), was Veranlassung war, diesen natürlichen Keim der Darmflora einzusetzen. Die intravenöse Verabreichung einer hohen Dosis lebender Bakterien wird von Deitch methodisch kritisiert, da es mehr einer Intoxikation als einer Infektion ähneln würde (Deitch 2005). Basierend auf den Überlegungen, dass die verwendeten *E. coli* Stämme oft avirulent sind und sich nicht *in vivo* vermehren, ist die Injektion einer hohen Dosis lebender Bakterien notwendig.

Der Einsatz des „two-hit“-Modells in der Sepsisforschung ist *per se* mit dem Nachteil verbunden, dass die beobachteten pathologischen Prozesse der Inflammation und Apoptose nicht eindeutig den jeweiligen Insulten zugeordnet werden können. Doch gerade aus diesen Gründen verkörpert dieses Zusammenwirken pathogener Prozesse den klinischen Alltag und ist daher als relevantes, experimentelles Sepsismodell anzusehen (Eissner et al. 2002).

Die meisten Kenntnisse über die Nierenpathophysiologie infolge einer Sepsis sind aus Tierexperimenten erlangt worden (Tiwari und Vikrant 2000), da die Schwere der Erkrankung an menschlichen Organen *in vivo* nicht nachgestellt werden kann. Als Versuchstier wurde das Schwein gewählt, da es im Vergleich mit anderen Nicht-Primatenspezies anatomische und physiologische Ähnlichkeiten zum Menschen aufweist (Dodds 1982, Li et al. 2007) und insofern häufig in der Forschung eingesetzt wird. Wernersson und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das Schwein im Gegensatz zur Maus dem menschlichen Genom ähnlicher ist, was eine einfache Übertragung der Ergebnisse auf menschliche Studien ermöglicht (Roehe et al. 2003, Wernersson et al. 2005). Laut Benninghoff und Schmidt (Tab. 18) bestehen sowohl die Schweinenieren als auch die menschlichen Nieren aus ca. zwei Millionen Nephronen und auch die Ausscheidungsfunktionen der Nieren beider Spezies zeigen Analogien auf (Dalmose et al. 2000). Daher eignet sich das Schwein als verwendete Nicht-Primatenspezies für experimentelle Sepsisuntersuchungen (Schlag und Redel 1998).

Tab. 18 Ähnlichkeiten der Nieren von Mensch und Schwein

	<i>Nieren Mensch</i>	<i>Nieren Schwein</i>
Anlage	paarig*	paarig*
Form	bohnenförmig*	bohnenförmig*
Aufbau	glatt, mehrwarzig*	glatt, mehrwarzig*
Nephronenzahl Mio./Niere	1*	1,2*
Serumkreatininspiegel mg/dl	1,2-1,4°	1,1-1,3°

*nach (Benninghoff und Drenckhahn 2003)

° nach (Schmidt und Thews 2000)

Die Versuchstiere wurden randomisiert in fünf Gruppen eingeteilt, wobei an der Sham-Gruppe lediglich die Präparation und anschließende Ektomie vorgenommen wurde. Deren Nieren waren demnach weder einer Ischämiezeit, noch einer Infektion ausgesetzt und sollten mit ihrer bestmöglichen Nierenfunktion als Vergleichsgruppe für den Narkoseeffekt und die operativen Eingriffe zwecks Monitoring dienen.

Die unmittelbare Übertragung von tierexperimentellen Daten auf die Situation beim Menschen ist sicher nicht möglich. Der Beobachtungszeitraum von acht Stunden nach Sepsisinduktion scheint kurz und muss nicht notwendigerweise mit der Entwicklung einer vollständigen Manifestation einer Immunreaktion auf den septischen Insult einhergehen. Da jedoch die Auswirkungen verschiedener VEL auf die Nierenfunktion und nicht die Reduktion der Letalität durch neue Therapieverfahren Gegenstand der vorliegenden Untersuchung waren, ist der gewählte Untersuchungszeitraum im septischen Schock als ausreichend anzusehen (Hill et al. 1980, Webb et al. 1991). Ein weiterer Kritikpunkt an tierexperimentellen Sepsismodellen ist die Größe der Gruppen, die jedoch aus Tierschutz rechtlichen Erwägungen auf fünf Tiere begrenzt wurden. Dennoch konnten wissenschaftlich adäquate Unterschiede in der Auswertung der Ergebnisse dargestellt werden, die im Rahmen der Studie einige Schlussfolgerungen erlaubten.

Der Versuchsaufbau wurde an aktuellen klinischen Leitlinien orientiert. Nach heutigen Empfehlungen der Surviving Sepsis Campaign sollte der zentralvenöse Druck in die Therapieentscheidung einbezogen werden, an dessen Zielbereich von 8-12 mmHg sich die Volumensubstitution ausrichtet (Dellinger et al. 2008).

5.1.2 Immunhistologische Methoden

Die Einteilung der histologischen Färbungen wurde in den verschiedenen Kompartimenten Glomeruli und Tubuli-interstitiellen Raum durchgeführt, da auf diese Weise differenzierter lokalisiert werden kann, in welchen Kompartimenten der Niere der größte Schaden entsteht. Unterschiedliche Krankheitsbilder wie z.B. die glomeruläre Nephritis und die interstitielle Nephritis, lassen sich dadurch besser unterscheiden.

Hierfür wurde eine große Anzahl eingefärbter Zellen in den Glomeruli als auch im Tubuli-interstitiellen Raum (jeweils 40) ausgezählt, um auch bei niedrigen Kontrollwerten stabile Daten bei der Darstellung der Entzündung und Apoptose zu erhalten. Die Auszählung erfolgte unter Verblindung der Gruppen, was zu einem Rückgang der unterschiedlichen Bewertung von Behandlungsergebnissen führen sollte (Schulz und Grimes 2002). Eine gewisse subjektive Beeinflussung der Daten kann natürlich nicht vollständig ausgeschlossen werden, auch wenn die Auswahl der Gesichtsfelder in den verschiedenen Kompartimenten repräsentativ erfolgt.

Die **Esterase**-Färbung mit der Naphthol-Chlorazetat-Methodik zeigt eine intensive Aktivität der humanen neutrophilen Granulozyten, die im Rahmen der körpereigenen Abwehr Vermittler unspezifischer Entzündungsreaktionen darstellen (Gomori 1955, Moloney et al. 1960). Eine Esterase-Aktivität anderer Phagozyten wie der von Mastzellen und Makrophagen wird kritisiert (Moloney et al. 1960). Durch deren einfache Handhabung und hohe Spezifität bei der Darstellung von Entzündungszellen wird die Esterase-Färbung routinemäßig in der Diagnostik hämatologischer Erkrankungen benutzt (Leder 1970).

Die immunhistochemische **TUNEL**-Färbung von Gewebeschnitten ist eine weit verbreitete, validierte Methode zum spezifischen Nachweis apoptotischer Zellen (Kelly et al. 2003, Prochazkova et al. 2003). Somit wurde diese, nach Beratung mit einem externen Sachverständigen aus dem Institut für Pathologie der MHH, als Methode der Wahl zur raschen Identifizierung und Quantifizierung einer späten apoptotischen Zelle (Negoescu et al. 1996) für die vorliegenden Untersuchung festgelegt. Allerdings ist zu bedenken, dass die Anzahl der in einer immunhistochemischen Färbung sichtbaren apoptotischen Zelle oft sehr gering ist und nur einen limitierten Einblick in das apoptotische Geschehen eines Gewebes gibt. Wenn man davon ausgeht, dass in einem histologischen Schnitt,

der immer nur eine Momentaufnahme der Situation darstellen kann, 1% der Zellen apoptotisch sind und die Beseitigung durch die Makrophagen ca. eine Stunde in Anspruch nimmt, dann werden innerhalb von 24 Stunden ca. 25% des Gewebes verschwunden sein (Savill 1997). Demnach sollte der Nachweis apoptotischer Zellen an Schnittpräparaten kritisch analysiert werden, da die Sensitivität erheblich variieren kann (Labat-Moleur et al. 1998). So ist bekannt, dass DNA-Brüche in nahezu allen Zellen vorkommen und insofern eine unspezifische Beifärbung von vereinzelt Nekrosen bei massivem DNA-Abbau nicht ausgeschlossen werden kann (Darzynkiewicz et al. 1994). Allerdings hat TUNEL das Spezifikum eines weit höheren Maßes an apoptotischer DNA-Fragmentierung gegenüber der Nekrose (Negoescu et al. 1998). Ihre häufigste Verwendung findet sie derzeit in der Hämato-Onkologie.

Die histochemische Technik der **Lektin-Bindung** macht es möglich, bestimmte Nierenstrukturen, die nicht oder nur mit Schwierigkeiten durch konventionelle Histologie dargestellt werden können, zu unterscheiden. Lektine wie PHA-E gewinnen als spezifische Marker des proximalen Tubulusepithels (Silva et al. 1993) für weitere Studien über die Morphologie und Physiologie der Niere zunehmend an Bedeutung (Wittmann und Sinowatz 1989). Somit werden sie zur Quantifizierung Tubuli-interstitieller Erkrankungen empfohlen (Ivanyi und Olsen 1991).

Ergänzend wurden weitere spezielle Färbungen zur deskriptiven Analyse herangezogen.

5.1.3 Molekularbiologische Methoden

Neben den sehr speziellen Färbungen auf singulärer Ebene der Histologie, wurden die Expressionsprofile einzelner wesentlicher Gene der Sepsis betrachtet. Für einen zuverlässigen quantitativen mRNA Nachweis spezifischer Zielgene ist die **q-PCR** ein weit verbreitetes etabliertes Modell (Fleige und Pfaffl 2006). Vorteil der Fluoreszenz-basierten qRT-PCR (Bustin 2002) sind die Sensitivität sowie das Potenzial einer durchweg präzisen relativen Quantifizierung (Heid et al. 1996, Lockey et al. 1998, Huggett et al. 2005). Der entscheidende Nutzen besteht somit in der Möglichkeit, große Probenmengen in kurzer Zeit und mit relativ geringem Arbeits- und Materialaufwand zu untersuchen. Da sich in einer adäquaten Anzahl an Untersuchungen gezeigt hat, dass kein Gen als universell einsetzbares Referenzgen geeignet ist, wurde im Einklang mit ent-

sprechenden Vorgaben aus der Literatur und durch Testung alternativer Referenzgene (z.B. Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) β -ACTB als interne Kontrolle verwendet (Vandesompele et al. 2002, Etschmann et al. 2006). So wurde β -ACTB als einziges Kontrollgen in mehr als 90% der Fälle in bedeutenden wissenschaftlichen Beiträgen benutzt (Suzuki et al. 2000), da es zu jeder Zeit in einer relativ hohen Anzahl in fast allen Zellen stabil exprimiert wird (de Jonge und Levi 2001, de Jonge et al. 2007). Bisher gibt es wenige Informationen über die Stabilität der Gene von Schweinen. Erkens und Mitarbeiter untersuchten daher zehn Referenzgene in Schweinen, wobei sich β -ACTB als eines der stabilsten Gene erwies (Erkens et al. 2006). Die Berechnung nach Pfaffl mit Bezug auf ein Referenzgen berücksichtigt die Fehler, die bei der spektrophotometrischen Bestimmung der mRNA-Konzentration und infolge unterschiedlicher Effizienzen beim Umschreiben der mRNA in cDNA auftreten können.

Damit ein Gen als differentiell exprimiert gilt, sollte eine Änderung der Transkriptionsrate mindestens um den Faktor 1,5-2 gewährleistet sein. Hierdurch werden mögliche Fehler in Betracht gezogen, die sich individuell bzw. durch die Vielzahl der einzelnen Arbeitsschritte von der Zell- und Gewebepräparation bis hin zur Auswertung der RT-PCR ergeben (Bustin 2002).

Durch Verwendung eines Nierengesamthomogenats war keine Zuordnung der Expressionsveränderung auf bestimmten Kompartimenten der Niere, z.B. Glomeruli, Tubuluszellen, Endothel oder auch adhärenente oder infiltrierte Leukozyten möglich. Zudem wurde kein Nachweis für Veränderungen auf Proteinebene in der vorliegenden Untersuchung berücksichtigt. Die Limitation erfolgt hier auf den Genexpressionsveränderungen und morphologischen Kriterien im Rahmen des septischen Nierenschadens infolge der Behandlung mit verschiedenen VEL.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Immunhistologische Ergebnisse

Entzündung Die histologische Untersuchung der Nieren zeigte aktivierte PMN, die durch Schock induzierte Ischämie und die anschließende Reperfusion typischerweise auftreten, wobei deren Infiltration in Reaktion auf das Geschehen ein bisher unverstandenes Phänomen darstellt (Ysebaert et al. 2000). Mithilfe der Esterase-Färbung konnte in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, dass Entzündungsprozesse sowohl gesondert durch die Sepsis als auch infolge kolloidaler Volumenersatztherapie mit unterschiedlicher Ausprägung in der Niere stattfinden. Der Anteil entzündlicher Zellen der Sham-Tiere scheint Stress bedingt durch den operativen Eingriff aufzutreten. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen konnten auch Hueter et al. unter Gabe von Ringer-Laktat-Lösung Entzündungszeichen in einem isolierten septischen Nieren-Perfusionsmodell (Hueter et al. 2009) aufzeigen, was darauf hindeutet, dass eine gesicherte Sepsis trotz adäquater kristalloider Volumentherapie mit einer assoziierten Entzündung in den Nieren einhergeht. Allerdings verwendeten Hueter et al. in deren Experiment eine NaCl-basierte Ringer-Laktat-Lösung.

Bisher sind Ringer-Laktat- und Ringer-Azetat-Lösungen als miteinander austauschbare VEL im Sinne eines Basenersatzes bekannt. So setzen beide äquimolar Hydrogencarbonat (HCO_3^-) frei, das eine wichtige puffernde Wirkung auf den pH-Wert des Blutes hat. Zur Metabolisierung des Laktats (Adams 2007) wird im Vergleich zu Azetat ein bedeutender zusätzlicher Sauerstoffbedarf (Verhältnis 3:2) benötigt (Knotzer et al. 2006). Um neben der Sepsis bedingten Ischämie kein zusätzliches Sauerstoffdefizit herauszufordern, wurde Ringer-Azetat-Lösung in den vorliegenden Experimenten genutzt. Studien berichten von Vorteilen bei Verwendung isotoner NaCl-Lösungen gegenüber Ringer-Laktat-Lösungen infolge ischämiebedingter Neutrophilen-Aktivierung. So kam es unter Verwendung von Ringer-Laktat nach Initiierung eines hämorrhagischen Schocks durch Trauma zu einem vermehrten PMN-Anstieg in mesenterischen Lymphknoten-Proben von Ratten (Deitch et al. 2003). Ergänzend konnte in einem hämorrhagischen Schockmodell an Ratten eine gesteigerte Neutrophilen-Sequestrierung (Abkapselung) im Interstitium der Ratteninniere aufgezeigt werden, wobei sich diese deutlicher unter Ringer-Laktat- und hypertoner 7,5% NaCl-Lösung, als bei 0,9% NaCl-Lösungen herauskristallisierte (Hirano et

al. 2006). Diese Reaktionen sind als direkte Wirkung auf Endotoxine und auf die Komplementwirkung zurückzuführen (Burrows 1975, Richman et al. 1981) und scheinen an der Entwicklung der akuten tubulären Nekrose sowie einer Leukopenie beteiligt zu sein (Richman et al. 1980).

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich, dass alle kolloidalen Lösungen zu einem verstärkten Einstrom von PMN führten, wobei insbesondere 10% HES 200 sowohl innerhalb der Glomeruli (178) als auch im Tubuli-interstitiellen Raum (11,4) vermehrt entzündliche Auswirkungen hatte. Bezüglich der PMN-Anzahl in den Glomeruli wurden signifikante Unterschiede sowohl gegenüber der Sham-Tiere (64,3) als auch der septischen Ringer-Azetat Gruppe (84,8) deutlich. Bekannt ist, dass glomeruläre Zellen an der Rekrutierung inflammatorischer Zellen mitwirken (Jocks 1997). Darüberhinaus sind PMN anhand ihrer spezifischen Granula selbst in der Lage Endothelzellen zu passieren und Zellstrukturen oder Zellfunktionen zu stören, was zur Induktion eines akuten und möglicherweise irreparablen Gewebeschadens führen kann. Es gibt immer mehr Anzeichen dafür, dass mesangiale Zellen und neutrophil vermittelte chemotaktische Substanzen (z.B. IL8, Leukotrine, Plättchen aktivierender Faktor) die Aktivierung neutrophiler Granulozyten, deren Migration in das Nierengewebe sowie die Zunahme glomerulären Schadens fördern (Heinzelmann et al. 1999). Infolge der vermehrten glomerulären Infiltration mit Entzündungszellen könnte dies, im Rahmen des intrarenalen ANV (Kuhlmann et al. 2008), histopathologisch für eine Glomerulonephritis (Thomas 2006) unter 10% HES 200 sprechen. Als dritthäufigste Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz (Marti et al 2003) sollte dieses Krankheitsbild frühzeitig behandelt oder falls möglich vermieden werden. Ein dauerhaftes Versagen der Nierenfunktion wäre die Folge.

Neben der glomerulären Schädigung konnte in der vorliegenden Untersuchung unter 10% HES 200 (11,4) gegenüber den gesunden Versuchstieren (3,8), den Ringer-Azetat-Tieren (6,4) und den 4% Gelatine-Tieren (5,9) auch eine signifikant vermehrte Einwanderung von PMN in das Tubuli-interstitielle Kompartiment festgestellt werden. Keine deutliche Zunahme im Vergleich zu 10% HES 200 ergab sich unter der Therapie mit 6% HES 130 (9,3). Jedoch traten unter 6% HES 130 signifikant mehr Entzündungszellen auf, als es bei der gesunden Kontrollgruppe der Fall war. Ähnliche Ergebnisse konnten von Hueter et al. in einem isolierten Nierenperfusionsmodell gezeigt werden, wobei beide HES-

Lösungen im Vergleich zu einer Ringer-Laktat-Lösung deutlich mehr interstitielle Proliferation und Makrophageninfiltration verursachten. 10% HES 200/0.5 hatte, verglichen mit 6% HES 130/0.42, eine eher proinflammatorische Wirkung und verursachte ausgeprägtere tubuläre Schäden (Hueter et al. 2009). Eine Erklärung für die verstärkte Schädigung im Tubuli-interstitiellen Bereich unter 10% HES 200 könnte sein, dass sich als Folgeerscheinung des Glomeruli-Schadens eine interstitielle Nephritis entwickelt hat. Neuere Untersuchungen gehen davon aus, dass es infolge einer Mediatoren vermittelten Permeabilitätsstörung (Mims et al. 2006) in den Glomeruli zu einer vermehrten Filtration von Makromolekülen kommen kann (Kuhlmann et al. 2008). Dementsprechend führt eine länger andauernde, stärkere glomeruläre Proteinurie zur Schädigung der Nierenröhrchen (D'Amico und Bazzi 2003) und wahrscheinlich zu einer Aktivierung von Entzündungsprozessen im Tubuli-interstitiellen Raum (Kuhlmann et al. 2008). Ein möglicher Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Entzündungslokalisationen scheint somit in der Molekülgröße der einzelnen HES-Lösungen zu liegen. Niedrigmolekularere Molekülfraktionen wie 6% HES 130 scheinen nach den Ergebnissen des vorliegenden Experiments eher kürzer in den Glomeruli zu verweilen und somit lokal weniger entzündliche Reaktionen auszulösen bzw. eine primäre Schädigung des Tubuli-Interstitiums zu verursachen. Sowohl eine primäre Schädigung der Glomeruli (Glomerulonephritis) als auch des Tubuli-Interstitiums (tubulointerstitielle Nephritis, intratubuläre Obstruktion) sind neben einer primären Schädigung der Blutgefäße (Stenosen der intrarenalen Gefäße) wichtige intrarenale Ursachen für das Entstehen eines ANV (Siegenthaler 2005). Die Untersuchung von menschlichem Biopsiematerial zeigte, dass Tubuli-interstitieller Schaden und das Ausmaß interstitieller Infiltration mit Entzündungszellen Parameter sind, die unabhängig von der primären Läsion mit dem Verlust der Nierenfunktion und der Progression zur terminalen Niereninsuffizienz korrelieren (Risdon et al. 1968, Bohle et al. 1996). Weitere Erklärungen für scheinbar HES induziertes renales Inflammationsgeschehen konnten Studien zeigen, die eine reduzierte zielgerichtete Wanderung (Chemotaxis) von PMN durch endotheliale Zellschichten in den Extravasalraum durch HES feststellten. Jedoch müssen die möglichen klinischen Folgen eines moderaten Rückgangs dieser Extravasation in kritisch kranken Patienten noch bewertet werden (Hofbauer et al. 1999). Diese abnehmende Verfügbarkeit neutrophiler Granulozyten könnte mit einer sinkendenden

Immunkompetenz bei steigender Zahl den Körper heimsuchenden Erregern einhergehen (da Silva et al. 1994). Des Weiteren könnte die HES induzierte verringerte PMN-Chemotaxis zur Persistenz von Bakterien führen. So zeigen Daten von Wagner und Mitarbeiter, dass infiltrierte und lokal aktivierte PMN nicht mehr zur Chemotaxis fähig sind (Wagner et al. 2004) und somit ihre Phagozytenfunktion nicht am Ort des Geschehens ausüben können. Die Autoren postulieren, dass dadurch scheinbar das Phänomen der „frustrierten Phagozytose“ ausgelöst wird, indem PMN zur Freisetzung ihrer zytotoxischen Moleküle und proteolytischen Enzyme aktiviert werden und diese in die Umgebung freisetzen. Letztendlich ist dies mit einer progredienten Gewebedestruktion verbunden (Saloga et al. 2006). Die zu Grunde liegende Vernetzung zwischen Entzündung und Apoptose in Hinblick auf HES induziertes Nierenversagen muss weiter aufgeklärt werden.

Apoptose Immunhistologisch stellte sich im vorliegenden Experiment, zwölf Stunden nach Sepsisinduktion, ein insgesamt rarer Anteil apoptotischer Zellen in beiden Kompartimenten dar. Gründe hierfür könnten in einem verzögerten Zelltod mit einer Persistenz der Entzündung liegen (Taneja et al. 2004, Aoyama et al. 2009). So konnten Taneja et al. *in vitro* an PMN eine verzögerte und somit unterdrückte Apoptose bis zu 24 Stunden nach Sepsis-Initiierung feststellen, was laut Keel im Zusammenhang mit Veränderungen der Signaltransduktionswege proinflammatorischer Zytokine zu stehen scheint und mit einem schweren klinischen Verlauf der Sepsis einhergeht (Keel et al. 1997, Oberholzer et al. 2001b, Oberholzer et al. 2001a). Savill wies gegensätzlich dazu darauf hin, dass apoptotische Zellen bereits innerhalb weniger Stunden abgebaut sind und somit kein Nachweis mehr möglich ist (Savill 1997). Auch im Experiment von Messaris et al. zeigte sich sechs Stunden nach Sepsisinduktion ein signifikanter Anstieg aller Zelltodarten mit anschließendem Rückgang des Zelluntergangs (Messaris et al. 2008). Die zeitliche Verteilung verschiedener Zelltod-Marker, wie z.B. Bcl-2 („B-cell lymphoma 2“), BAX (bcl-2 assoziiertes x Protein) und CASP8, zeigen konsequente Muster, sodass eine beginnende Sepsis wahrscheinlich Initiator apoptotischer Ereignisse ist (Messaris et al. 2008).

Der zu vernachlässigende Anteil apoptotischer Zellen im Nierengewebe unstimulierter gesunder Kontrolltiere ist hingegen vermutlich mit dem Phäno-

men der Spontanapoptose aus unterschiedlichen Quellen zu erklären. Diese geht physiologisch durch Vermittlung des proapoptotischen Enzyms CASP3 (Taneja 1999) mit einer Erneuerung von Tubulusepithel einher. Gegensätzlich dazu fanden Messaris et al. in ihrem Sepsismodell in Mäusen, dass vor allem in der Gruppe verstorbener Tiere überwiegend tubuläre Zellen von Apoptose betroffen waren (Messaris et al. 2008). Das könnte darauf hindeuten, dass dieser, mit der TUNEL-Methode detektierte Zellverlust, sich als Folge der Sepsis einstellt und Tubuluszellen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber einer Ischämie-Reperfusionssequenz aufweisen (Carden und Granger 2000).

Entgegengesetzt der Esterase-Färbung konnte unter Ringer-Azetat kein schädlicher Effekt bezüglich des Zelltodes dargestellt werden. Auch in anderen Groß-Tiermodellen konnten bisher keine zytotoxischen Eigenschaften von Ringer-Lösungen bestätigt werden (Ayuste et al 2006.). Dennoch wird gegenwärtig zwischen Ringer-Laktat-Lösung und Ringer-Azetat-Lösung unterschieden, wobei Ayuste und Mitarbeiter durch die Beseitigung von D-Laktat aus Ringerlösungen weniger apoptotischen Zelltod in Leber und Lunge nach hämorrhagischem Schock bei Schweinen nachweisen konnten. Die Nierenrinde ist wie Leber, Muskel und Myokard mit den entsprechenden Enzymmustern zum Azetat-Metabolismus ausgestattet (Knowles et al. 1974, Kuze et al. 1986), was unter anderem den positiven Effekt gegenüber Laktat-haltigen Lösungen erklären könnte.

Zudem fielen in der vorliegenden Untersuchung scharfe Abgrenzungen TUNEL-positiver Prozesse vom umliegenden Nierengewebe auf. Segerer et al. konnten im Rahmen renaler thrombotischer Mikroangiopathie derartige Beobachtungen machen (Segerer et al. 2002). Dieser Aspekt forderte weitere histologische Untersuchungen, durch z.B. eine MSB-Färbung, die im nachfolgenden diskutiert werden sollen.

Verglichen mit der Lokalisation entzündlicher Prozesse waren die Glomeruli wenig bis gar nicht von Apoptose betroffen. Dennoch konnte wieder unter 10% HES 200 (0,65) ein vermehrter Zellschaden visualisiert werden. Ungleich zum Nierenmark, das weniger als 10% der renalen Durchblutung erhält, wird die Nierenrinde mit dem überwiegenden Anteil an Glomeruli physiologisch enorm durchblutet. Somit könnte man ursächlich auf eine hämodynamische Instabilität mit nachfolgender lokaler Ischämie infolge HES-Applikation schließen (Messaris et al. 2008). Barth zeigte hierzu in einem septischen Schweinemodell, dass

durch frühzeitige Gabe von 100% Sauerstoff positive Auswirkungen auf die Organfunktion mit weniger TUNEL-markierten apoptotischen Zellen erreicht werden können (Barth et al. 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte infolge der Volumentherapie mit 10% HES 200 (27) ein signifikanter Anstieg apoptotischer Zellen im Vergleich zur Sham-Gruppe (1,6) im Tubuli-interstitiellen Kompartiment der Niere festgestellt werden. Stander et al. betrachten diesen Aspekt kritisch. Anlässlich der kolloidalen Volumenersatz-Applikation sei Apoptose eine additive Wirkung in vorgeschädigtem Gewebe und könnte nicht *per se* mit der HES-Therapie begründet werden (Ständer et al. 2002). Da sich jedoch ein nicht signifikanter Unterschied zwischen den beiden HES-Gruppen zeigte, könnte man davon ausgehen, dass 6% HES 130 im Gegensatz zu 10% HES 200 morphologisch vermutlich weniger Einfluss auf das Absterben renaler Zellen hat. Auch Wei et al. konnte mittels TUNEL-Färbung keinen nachteiligen Effekt unter 6% HES 130 gegenüber 0,9% NaCl-Lösung feststellen (Wei et al. 2009). Im Unterschied zur vorliegenden Untersuchung waren die Versuchstiere Mäuse und das Untersuchungsmaterial alveolare Epithelzellen.

Als weiteres wesentliches Ergebnis dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es auch unter der Behandlung mit Gelatine-Lösung zu einem deutlichen Anstieg apoptotischer Zellen (15,8), vorrangig im Tubuli-interstitiellen Kompartiment, kam. Altunkan et al. konnten in einem Ischämie-Reperfusions-Modell an Hasen immunhistochemisch einen Anstieg Bcl-2 Proteine unter 4% Gelatine ermitteln, wobei die Untersuchung in Lebergewebe erfolgte (Altunkan et al. 2002).

Weitere histologische Analysen zur inflammatorischen und apoptotischen Wirkung der untersuchten VEL auf die verschiedenen Kompartimente Glomeruli und Tubuli-interstitieller Raum liegen zum derzeitigen Zeitpunkt nicht vor. Jedoch sind verschiedene molekularbiologische Analysen hinsichtlich der Signalkaskaden des Zelltodes durchgeführt worden, sodass im Rahmen der vorliegenden Studie verschiedene Parameter auf Genexpressionsebene getestet worden.

Tubulusepithelschaden Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnten Zeichen eines ANV in allen Nieren septischer Versuchstiere aufgezeigt werden, wobei sich neben den bereits erwähnten entzündlichen Zellinfiltraten auch Zellschwellung und unterschiedlich stark ausgeprägte Tubulusepithelschäden dar-

stellten. Interessanterweise konnten Versuchstiere, die mit 10% HES 200 behandelt wurden, immer wieder mit besonders hohem Tubulusepithelschaden-Anteil detektiert werden, was sich mit aktuellen histopathologischen Erkenntnissen über dessen Nebenwirkung deckt (Cittanova et al. 1996, Dehne et al. 1997, Hueter et al. 2009). Sowohl mittels Jones-Färbung als auch durch Lektinbindung und anschließender semiquantitativer Auswertung konnten enorme Bürstensaum-Destruktionen und Rarefizierungen als Zeichen des akuten Tubulusepithelschadens nachgewiesen werden. Unter den restlichen Subgruppen der septischen Versuchstiere konnte hingegen ein kaum merklicher Unterschied festgestellt werden. Der proximale Tubulus der Niere besitzt eine Schlüsselfunktion bei der Wiedergewinnung der beinahe gesamten Menge des von der Niere filtrierten Kochsalzes und Wassers. Durch Verlust der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus werden die hierfür verantwortlichen Transportsysteme und die Protein-Lipid-Polarität der Membran gestört, was zum Teil mitverantwortlich für die reduzierte Natrium- und Glucosereabsorption und somit die Abnahme der glomerulären Filtration ist (Molitoris 1991).

Bezüglich des Tubulusepithelschadens als Kennzeichen eines ANV ergaben die vorliegenden Daten in Hinblick auf die Hypothese signifikante Unterschiede zwischen 10% HES 200 und den übrigen Lösungen, was die Ergebnisse der bereits erwähnten VISEP-Studie stützt. Weitere Befunde trugen Dehne et al. bei, die bei operativen Intensivpatienten im Vergleich von 10% HES 200/0,5 mit einer nicht genau spezifizierten Kontrollgruppe durch Bestimmung differenzierter renal Parameter (α 1-Mikroglobulin, N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase) einen negativen Effekt der untersuchten HES-Lösung auf die Tubuli beschrieben (Dehne et al. 1997). Diskutiert werden in diesem Zusammenhang onkotisch bedingte Ursachen, wobei die Rückresorption rasch ausgeschiedener kleinerer Moleküle mit erhöhter Urinviskosität und vermindertem Urinfluss einhergehen (Herrath und Thimme 1990). Schon in früheren Publikationen wurde die Bildung eines hyperonkotischen, hochviskösen Primärharns nach der Zufuhr von VEL mit hohem kolloidosmotischen Druck bei gleichzeitig bestehender Dehydratation als entscheidender Auslöser für eine akute Oligo-/Anurie betrachtet (Mailloux et al. 1967, Moran und Kapsner 1987). In einer multizentrischen, europäischen Beobachtungsstudie (CRYCO) wurden hyperonkotische *versus* hypoosmotische VEL an 822 Schockpatienten auf Intensivstation bezüglich deren nephrotoxischer Wirkung dokumentiert (Schortgen et al. 2008).

Hyperonkotische Lösungen, insbesondere die Verwendung von 20% Albumin-Lösung waren mit einer signifikant höheren 28-Tage-Letalität assoziiert. Als Kritikpunkt dieser CRYCO-Studie sollte erwähnt werden, dass alle HES-Lösungen der hyperonkotischen Gruppe zugeordnet waren und schwerkranke Patienten eher mit hyperonkotischer HES-Lösung als beispielsweise Gelatine oder Ringer-Lösung behandelt wurden (Wiedermann 2009, Davidson 2009). Gegenätzlich dazu ergab sich in einer Metaanalyse, in der 25 randomisierte klinischen Studien mit insgesamt 1485 Patienten eingeschlossen waren, kein Hinweis auf eine Nierenschädigung durch hyperonkotisches Albumin (Jacob et al. 2008). Andere Untersuchungen zeigten, dass die Dysfunktion peritubulärer Kapillaren ein frühes Ereignis im Sepsis bedingten ANV ist, die zu tubulärem Stress und somit tubulärer Nierenschädigung führen können (Wu et al. 2007). Darüberhinaus sensibilisieren Endotoxine das renale Tubulusgewebe für ischämisch-hypoxische Ereignisse. Letztlich führt dies zu einer verschlechterten tubulären Regeneration (Fan et al. 1995).

Osmotische Nephrose Histopathologisch wird eine osmotische Nephrose mit Vakuolisierung der Tubulusepithelien beschrieben (Legendre et al. 1993, Ginz et al. 1998), wobei davon ausgegangen werden kann, dass der vakuoläre Transport die Zellen vor osmotischen Schädigungen durch die rückresorbierte Substanz bewahrt (Dr. med. Clemens Bockmeyer, MHH, persönliche Mitteilung) und somit keine nachteilige Beeinträchtigung der tubulären Nierenfunktion zur Folge hat. Dieses Phänomen konnte bei den verschiedensten Volumentherapien identifiziert werden (Legendre et al. 1993, Hueter et al. 2009) und ist daher nicht explizit auf eine Nebenwirkung von HES zurückzuführen. So wurden diese unspezifischen Läsionen auch in Patienten, die Mannitol, hypertone Glukose-Lösung und Zyclosporin A erhielten, gefunden und konnten folglich mit keiner Funktion in Verbindung gebracht werden (Legendre et al. 1993). Dickenmann et al. fügten dem hinzu, dass diese morphologischen Veränderungen dosisabhängig sind, im gesunden Nierengewebe innerhalb weniger Tage reversibel und von geringer funktioneller Bedeutung sind (Dickenmann et al. 2008). Im Gegensatz zu Schortgen et al., die nur unter 6% HES 200 osmotische nephroseähnliche Nierenveränderungen feststellten (Schortgen et al. 2001), konnte in der vorliegenden Untersuchung mittels Standardfärbung (PAS-Färbung) folgendes gezeigt werden: Eine dezente Vesikelbildung, eine Abfla-

chung der proximalen Tubulusepithelzellen und eine Ausweitung des Tubuluslumens als Zeichen einer osmotischen Nephrose wurden auch in Versuchstieren, die mit Gelatine therapiert wurden, nachgewiesen. Diese Speicherung in Form der "osmotic nephrosis like lesions" ist für Gelatine wegen der geringen Unterschiede zu anderen Eiweißen analytisch kaum fassbar und darüberhinaus wegen der guten Abbaubarkeit nur von kurzer Dauer (Adams 2007). Hingegen ist für HES eine zusätzliche Speicherung im renalen Retikuloendothelialen System (RES) für längere Zeit (bis zu mehreren Monaten) gesichert (Ginz et al. 1998), wobei die PMN davon unberührt sind. Sind hingegen Makrophagen als Teil des RES betroffen, ist die Aufnahmefähigkeit und somit die Klärfunktion des RES im Sinne der Sanarelli-Schwartzman-Reaktion limitiert (Reimann et al. 2000). Dies geht mit herabgesetzter Immunkompetenz einher und wird insbesondere bei kritisch kranken Patienten im Schock oder bei Sepsis relevant.

Akute tubuläre Nekrose Mittels PAS-Färbung konnten zudem Zeichen beginnender Nekrose des Tubulusepithels bei allen septischen Tieren dargestellt werden, wobei diese sehr unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Gegenätzlich der Meinung von Krautzig, der diese als Verursacher des ANV auffasst (Krautzig 2000), konnte die akute tubuläre Nekrose in vielen weiteren Studien nicht als Verursacher des septischen akuten Nierenversagens festgestellt werden. So konnte bei Berichterstattung von 184 Patienten mit septischen ANV nur in 22% der Fälle (26 Patienten) eine akute tubuläre Nekrose ausfindig gemacht werden (Langenberg et al. 2008).

Thrombotische Mikroangiopathie Die infiltrierten Entzündungszellen bilden zahlreiche profibrotische Zytokine und Wachstumsfaktoren, die zum fibrotischen Umbau des Organs beitragen (Kuhlmann et al. 2008). Eine nachfolgende Fibrosierung und Vernarbung zeigte sich mittels MSB-Färbung vor allem in hilusnahen Arteriolen unter HES- und Ringer-Azetat-Therapie, was vermutlich zu einer weiteren Verschlechterung der Nierenfunktion beiträgt (Kuhlmann et al. 2008). Eine durch Ringer-Therapie induzierte Störung der Hämostase konnten interessanterweise auch Schürholz et al. aufzeigen. So konnte in einem Tiermodell mit Schweinen bei einem Baseline-Wert von 100%, acht Stunden nach Sepsisinduktion, 121% thrombozytäre Mikrovesikel unter nicht näher bezeichneter Ringer-Lösung nachgewiesen werden, während sich im Vergleich zu 4%

Gelatine (41%) und 6% HES 200 (19%) deutlich weniger prokoagulante Aktivität zeigten (Schürholz 2004). Eine mögliche Erklärung könnte in einem geringen Volumeneffekt kristalloider Ringer-Lösung liegen. Um den ZVD aufrecht zu erhalten musste sowohl im Experiment von Schürholz et al. als auch im vorliegenden Experiment eine weitaus höhere Menge Ringer-Lösung infundiert (Tab. 3, Datenanhang) werden als es unter kolloidalen Lösungen nötig war. Letztendlich kann dies somit über Ödembildung zu einer unzureichenden Sauerstoffversorgung des Gewebes, Zerstörung funktioneller Zellen und schließlich zur Entwicklung einer Koagulopathie und zum multiplen Organversagen führen (Groeneveld 2000, Schuerholz et al. 2004). Neben dem scheinbaren Einfluss kristalloider Lösung auf die Blutgerinnung stellten sich auch unter der Einwirkung von 10% HES 200 Schäden im Glomerulum in Form glomerulärer fibrinreicher Mikrothromben dar. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in der Untersuchung von Coalson im septischen Schock, bei dem sich neben den glomerulären fibrinreichen Thromben auch das glomeruläre Kapillar-Endothel fokal ödematös und zerstört zeigte (Coalson et al. 1975). Der Stellenwert thrombotischer Mikroangiopathie bei Sepsis ist bisher noch nicht hinreichend geklärt.

Im Einzelfall der Probe Sy 48 (Sepsis + 10% HES 200, Tab. 4, Datenanhang) konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit starke Einblutungen und fibrinoide Wandnekrosen in den Arteriolen nachgewiesen werden. Das unterstreicht den vermehrten, vermutlich durch 10% HES 200 induzierten, glomerulären Schaden im akuten Nierenversagen und kann zu einem Übertritt der Wandnekrose in die Glomeruli führen (Böcker 2008). Zudem scheint HES eine Störung der Fibrinpolymerisation zu verursachen (Haas et al. 2007). So zeigte die Untersuchung von Innerhofer et al., dass infolge einer perioperativen Verabreichung von 6% HES 200 und 4% Gelatine eine erhöhte Gerinnselformung auftrat. Unter Ringer-Laktat-Lösung resultierte keine derartige Störung der Polymerisation (Innerhofer et al. 2002). Auch die Zellinfiltration mit PMN und die bestehende fibrinoide Wandnekrose können zu einer Verengung des Gefäßlumens führen, was die Entstehung eines Thrombus fördert (Forbes und Jackson 2008).

5.2.2 Molekularbiologische Ergebnisse

Bezüglich sepsisrelevanter Entzündungs- und Apoptose-Mediatoren existieren eine Reihe von Arbeiten. Diese sind bereits dahingehend erforscht, mit Ausnahme von CEB/P, dass sie als Proteine früher (Zytokine) oder später (P53 und CASP3) im Verlauf der Sepsis im Plasma der Patienten ansteigen (Osuchowski et al. 2006, Simmons et al. 2004, Meissner 2005, Zhang et al. 2006, Brabant et al. 2007).

TNF α und IL6 Verschiedene Studien zeigten, dass übermäßig hohe TNF α und IL6 Spiegel (>1000pg/ml) mit der Schwere der Sepsis sowie mit einem verschlechtertem Outcome septischer Patienten verbunden sind (Damas et al. 1992, Reinhart et al. 2006, Zanotti et al. 2002, Chawla et al. 2007, Bloos et al. 2008). In der vorliegenden Untersuchung konnten erhöhte mRNA-Expressionen beider Zytokine im Nierengewebe der Ringer-Azetat-Gruppe festgestellt werden, was die erhöhte Produktion dieser infolge der Sepsis unterstreicht und andere Forschungsergebnisse septischer Modelle stützt (Meyer et al. 1995, Zhai et al. 1999, Meissner 2005).

Pathophysiologische Erklärungen für eine TNF α -Expression im Nierengewebe scheinen darin begründet, dass das Zytokin über Phagozyten-Aktivierung zur Produktion weiterer Zytokine, wie IL6, IL1 und Chemokine stimuliert wird (Siegenthaler 2006b). Dies fördert die Chemotaxis und Adhäsion der Phagozyten an die glomerulären Zellen und scheint damit wesentlich zur glomerulären Schädigung beizutragen (Messmer et al. 1999, Riede et al. 2004). Auch die Bildung der intravaskulären Blutgerinnung wird durch TNF α gefördert, was die Endothelzellen schädigen und zu einer Nekrose der Zellen führen kann (Messmer et al. 2000, Neumann 2008). TNF α wäre zudem in der Lage, Apoptose in Nieren-Epithelzellen zu induzieren (Peralta Soler et al. 1996, Ortiz et al. 2000, Ramesh und Reeves 2002), wobei in Kleintier-Experimenten durch Hemmung bzw. Neutralisation von TNF α akute ischämische Nierenschäden reduziert werden konnten (Donnahoo et al. 1999, Daemen et al. 1999, Ramesh und Reeves 2002). Eine weitere Erklärung für diese Zytokin-Induktion könnte im „two-hit“-Modell begründet liegen. Wie oben bereits beschrieben, stellten Turnbull et al. eine gesteigerte Empfindlichkeit für die Manifestation einer Sepsis nach einem „first-hit“ fest (Turnbull et al. 1995). Gegensätzliche Effekte erzielten Zervos und Mitarbeiter. Sie untersuchten die Auswirkungen des Blutverlustes im Sinne eines hämorrhagischen Schocks auf eine nachfolgende Sepsis an Ratten. Resultate

tierend ergab sich eine frühe Induktion der TNF α -Genexpression infolge der Blutung, welche dann bei Endotoxingabe den erwarteten hohen Anstieg dieses Zytokins unterdrückte. Infolge dieses Mechanismus stellten Zervos et al. die These auf, dass ein zuvor stattgefundenener Schock eine immunmodulierende protektive Wirkung auf das Krankheitsgeschehen der Sepsis habe (Zervos et al. 1999). Bereits in einer früheren Untersuchung hatten Zervos et al. gezeigt, dass subletale Hämorrhagien schützend gegen letale, intraperitoneale Dosen von Endotoxinen wirkten (Zervos et al. 1997). Diese Ergebnisse sind kritisch zu betrachten, da dieser immunmodulierende Effekt bis *dato* nur an Ratten und Mäusen nach Endotoxingabe nachgewiesen wurde, was nur eingeschränkt die Bakteriämie imitiert. Auch die intraperitoneale Applikation des LPS ist umstritten. In beiden Studien erfolgte kein Volumenersatz und das Nierengewebe wurde nicht untersucht.

Des Weiteren wird vermutet, dass die Herunterregulierung von renalen Harnstoff-Transportern (UT-A1 bis A4) und Nieren-Chlorid-Kanälen für eine tubuläre Dysfunktion verantwortlich gemacht werden kann, wobei diese Herunterregulierung während eines LPS induzierten septischen ANV durch proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IL6 vermittelt wird (Schmidt et al. 2007). In einem *E. coli* induzierten Sepsismodell an Mäusen wiesen Cunningham et al. nach, dass die Wirkung des TNF α über renale TNF α -Rezeptoren vermittelt wird (Cunningham et al. 2002). Wie genau TNF α seine toxische Wirkung entfaltet, ist nicht vollständig geklärt. Apoptotische Prozesse scheinen jedoch über diese renale TNF α -Rezeptor-Aktivierung initiiert zu werden, die letztendlich zur Tubulusschädigung beitragen (Sano et al. 2000, Meldrum et al. 2001, Bonegio und Lieberthal 2002).

In der vorliegenden Arbeit führte die Behandlung mit Gelatine zu einer erhöhten TNF α und IL6 Expression, was mit den Resultaten anderer experimenteller Ergebnisse homogen ist und für eine zusätzliche schädigende Wirkung im Nierengewebe sprechen könnte. Mithilfe spezifischer ELISA-Kits konnten Feng et al. dazu ansteigende Protein-Levels für TNF α unter Behandlung modifizierter Gelatine verschiedener Dosierungen (Feng et al. 2007) beobachten. Des Weiteren stellten Boldt et al. im Plasma älterer herzchirurgischer Patienten ebenso wie Lee et al. in einem hämorrhagischen Schockmodell an Ratten einen deutlichen Anstieg von IL6 bei Therapie mit 4% Gelatine verglichen mit 6% HES 130 fest (Lee et al. 2005, Boldt et al. 2008). Auch andere Forschergruppen be-

richten von abgeschwächter bis sogar unterdrückter Entzündung unter HES. Lang et al. konnten eine deutlich geringere IL6 Serumkonzentration unter 6% HES 130 verglichen mit Ringer-Laktat feststellen (Lang et al. 2001, Lang et al. 2003). Ferner konnte sowohl auf Protein- als auch auf Genexpressionsebene unter Verabreichung von HES 130 eine deutlich unterdrückte TNF α -Produktion festgestellt werden (Feng et al. 2007, Boldt et al. 2008), was mit den vorliegenden Ergebnissen auf Genexpressionsebene übereinstimmt. Sowohl 6% HES 130 als auch 10% HES 200 scheinen alle ausgewählten Entzündungs- und Apoptosemarker zu unterdrücken. Diese Ergebnisse sprechen interessanterweise für einen antiinflammatorischen Effekt. Ein möglicher Mechanismus ist, laut Lv et al., die direkte Hemmwirkung von HES auf die Zellen, die proinflammatorische Mediatoren durch Endotoxinämie freisetzen. Andererseits könnte HES die Wechselwirkung zwischen LPS und Oberflächenrezeptoren der Zellen dahingehend regulieren, dass die inflammatorische Antwort durch LPS-Einwirkung herunterreguliert wird (Lv et al. 2006). Interessanterweise konnten Lv et al. mit Myeloperoxidase (MPO)-Färbung keine Neutrophilen-Infiltration unter HES in deren septischen Rattenmodell darstellen. Im Rahmen dieser Studie wurde darauf hingewiesen, dass die Herunterregulierung entzündlicher Faktoren infolge einer HES-Therapie bisher weder in der Niere noch in einem Schweinemodell nachgewiesen wurde und vermutlich nur unter Mitwirkung anderer Faktoren diese Wirkung entfalten kann.

Andere Forschergruppen konnten hingegen keinen antiinflammatorischen oder antiapoptotischen Effekt unter Verwendung von HES finden (Schaper et al. 2008). In einem *in vitro* Experiment mit Schafen konnten Su et al. sowohl unter 6% HES als auch unter 20% Albumin- und Ringer-Azetat-Lösungen einen signifikanten Anstieg von IL6 im Plasma nachweisen (Su et al. 2007). Eine geminderte TNF α -Expression infolge von HES-Applikation wurde mit Hemmung des LPS induzierten intrazellulären Transkriptionsfaktors NF-KB (nuklearer Faktor-kappa B) begründet. Anlässlich dessen Reprimierung wird auch von Zelluntergang berichtet (Brabant et al. 2007). Begründet wird dieser Widerspruch durch einen möglichen Wechsel einer Reaktion auf eine andere, in Abhängigkeit von Zeit und Stimulus (Liu und Malik 2006). So wäre zu erwarten, dass sich bei intravenöser Toxingabe anstatt intraperitonealer Bakteriengabe nach zwölf Stunden im septischen Schock ein stärkerer Insult abzeichnet, der auf Genexpressionsebene anstatt der vorliegenden moderaten Signale zu stärkeren Verände-

rungen auf Genexpressionsebene geführt hätte. Genauso wären zu einem späteren Zeitpunkt nach Sepsisinduktion infolge des vorliegenden Versuchsaufbaus andere Ergebnisse zu erwarten.

In Anbetracht der histologisch wertvollen ermittelten starken Entzündungs- und Apoptosezeichen unter HES-Applikation, verglichen mit der moderaten Unterdrückung aller untersuchten inflammatorischen und apoptotischen Mediatoren spricht dies für ein ungeklärtes Signaltransduktionsnetzwerk, bei dem auf dem Weg der Genregulierung zum Proteom sowohl aktivierende als auch inhibitorische Prozesse ablaufen, die letztendlich im Gewebe zu gesteigerter Entzündung und Apoptose führen. So kommt es z.B. bei P53 durch posttranslationale Modifikation zu einer Aktivierung durch Phosphorylierung die *de novo* auf Proteinebene zu anderen Ergebnissen als auf transkriptioneller Ebene führt. Des Weiteren erscheint es möglich, dass die verschiedenen Expressionsmuster durch einen unterschiedlichen zellulären Ursprung der Zytokinproduktion bedingt sind, z.B. Aktivierung durch infiltrierende Leukozyten gegenüber der Bildung durch parenchymale Nierenzellen (Ramesh und Reeves 2002). Zytokine tragen zudem dazu bei, die Inflamationsreaktion zu kontrollieren (Mims et al. 2006), was im Falle einer Inhibition dieser nur eingeschränkt möglich ist und die verstärkte Einwanderung von Entzündungszellen unter HES-Behandlung erklären könnte.

Von der Gesamtheit aller durchgeführten Untersuchungen sollten die Ergebnisse der PCR infolge HES therapierter Tiere jedoch am kritischsten betrachtet werden, da diese bei einer Transkriptionsrate von weit unter dem Faktor 2 nicht als differentiell exprimiert gelten können. Daher konnten nur Tendenzen aufgezeigt werden.

CASP3 Über die Bedeutung apoptotischer Prozesse im septischen Nierenversagen gibt es bisher wenige Untersuchungen auf Genexpressionsebene und noch weniger unter Therapie mit verschiedenen VEL. Andererseits ist jedoch bekannt, dass bei der Beschreibung und Quantifizierung von apoptotischen Zellen eine gute Korrelation zwischen CASP3-Markern und der TUNEL-Färbung besteht (Zhu et al. 2000, Duan et al. 2003). Somit wurde diese Effektor-CASP zur Untersuchung genutzt, wobei das Verfahren der RT-PCR zeitnah organspezifische Veränderungen der Wirtsreaktion abbilden kann (Supavekin et al. 2003). CASP spielen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und Ausfüh-

rung der Apoptose (Brabant et al. 2007) in der Sepsis, obgleich CASP3 auf intrinsischem Weg über Mitochondrien-CASP9 vermittelt oder extrinsisch über einen Todesrezeptor initiierten CASP8 vermittelten Weg aktiviert wird. Es gibt immer mehr Belege dafür, dass sich in bestimmten Fällen diese beiden Pathways gegenseitig aktivieren können (Hotchkiss und Nicholson 2006). Guo et al. berichten, dass infolge Endotoxin-Gabe ein signifikanter Anstieg der CASP3-Expression nachgewiesen werden konnte und akutes Nierenversagen von einer CASP Aktivierung abhängig ist. Mittels TUNEL-Färbung konnten 24 Stunden nach Sepsis-Initiierung apoptotische Kerne in Arteriolen, Tubuli und peritubulären Bereichen dargestellt werden (Guo et al. 2004). Gegensätzlich dazu konnte im gleichen experimentellen Setting durch einen CASP-Inhibitor apoptotischer Zelltod verhindert werden. Andere Studien stützen einen Überlebensvorteil infolge einer Hemmung von CASP (Weber et al. 2004, Wesche-Soldato et al. 2007). Im Experiment von Guo et al. wurde zudem eine verringerte Neutrophilen-Akkumulation aufgezeigt und die entzündliche Reaktion in der Niere verbessert (Guo et al. 2004). Studien belegen, dass CASP somit nicht nur am Zelltod beteiligt sind, sondern auch eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der entzündlichen Reaktion während der ersten Phase der Hyperinflammation spielen (Guo et al. 2004, Hotchkiss und Nicholson 2006). Überraschenderweise können CASP auch an der Lymphozytenaktivierung und Proliferation beteiligt sein (Perfettini und Kroemer 2003, Newton und Strasser 2003, Creagh et al. 2003). Angesichts dieser Komplexität ist die Beurteilung der Frage, ob CASP-Aktivierung Zellvermehrung, Zelldifferenzierung oder Apoptose induziert, schwierig, ebenso wie eindeutige Schlussfolgerungen über die genauen „Pathways“ der Apoptose während einer Sepsis (Hotchkiss und Nicholson 2006).

Auch im vorliegenden Ansatz konnten die Ergebnisse der CASP3-Transkription nicht hinreichend pathophysiologisch erklärt werden. So konnte eine CASP3-Expression sowohl unter Ringer-Azetat-Therapie als auch unter Behandlung mit 4% Gelatine festgestellt werden, währenddessen HES vermutlich keine CASP3 vermittelten Schädigungen auf Genexpressionsebene im Nierengewebe induziert. Die moderate Induktion durch HES 200 könnte man als Ausreißer bewerten. Interessanterweise scheint vor allem 6% HES 130 CASP3 und somit apoptotische Signalwege zu hemmen, was entgegengesetzt der Meinung von Duan und Garner (2003) nicht im Einklang mit den histopathologischen Ergeb-

nissen der TUNEL-Färbung steht. Somit spielen wahrscheinlich, ähnlich den Ergebnissen der proinflammatorischen Zytokine, eine Reihe unbekannter Faktoren bei der Apoptoseinitiation eine Rolle, die es zu klären gilt. Der Aktivierungszustand der Zytokine, das Stadium des Zellzyklus, das Ausmaß des apoptotischen Stimulus und die Art der Bakterien scheinen alle in diesen Mechanismus einzugreifen (Hotchkiss und Nicholson 2006). Offensichtlich kann der Körper gram-negative Bakterien im frühestmöglichen Stadium registrieren (Mims et al. 2006). Zudem wurde bei höheren Konzentrationen von bakteriellen Lipoproteinen (>1000 ng/ml) im Gegensatz zu niedrigeren Konzentrationen (<1000 ng/ml) antiapoptotische Effekte *in vitro* an PMN beobachtet (Power et al. 2004). Da in der vorliegenden Arbeit in allen Versuchstieren die gleiche Anzahl an Bakterien verwendet wurde, könnte das auf ein verzögertes Beseitigen dieser Bakterien unter HES schließen lassen. Zudem sind bestimmte Zelltypen, wie z.B. Lymphozyten und Magen-Darm-Epithelzellen vermutlich anfälliger gegenüber Apoptose in der Sepsis als andere (Hiramatsu et al. 1997, Chung et al. 1998, Oberholzer et al. 2001b).

P53 Protein 53 ist ein durch Stress induzierter Transkriptionsfaktor, der durch eine Reihe von negativen Impulsen einschließlich DNA-Schädigung und Hypoxie aktiviert werden kann. Ist die Funktion einer Zelle geschädigt, wird die Expression vom P53 erhöht und führt zu Wachstumsarrest oder Apoptose der geschädigten Zelle (Lowe et al. 1993, Polyak et al. 1997). P53 scheint zudem ein wichtiger Auslöser des Zelltodes nach ischämischer Nierenschädigung zu sein (Dagher 2004) und könnte zukünftig in der Therapie des ANV eine wesentliche Rolle spielen (Kindt et al. 2008).

Infolge HES-Applikation scheint das Tumorsuppressor-Protein P53 in der vorliegenden Untersuchung reprimiert bzw. unbeeinflusst zu sein. Möglicherweise könnte es auf diese Weise seiner Funktion als „Wächter des Genoms“ nicht hinreichend gerecht werden und stellt somit wahrscheinlich keinen Vorteil der Therapie dar. Komarova und Mitarbeiter stellten darüberhinaus hohe metabolische Entzündungsmarker im Gewebe von P53-defizienten Mäusen mit einer zusätzlichen Überempfindlichkeit gegenüber LPS fest (Komarova et al. 2005). Eine mögliche Erklärung wäre, dass eine Unterdrückung des Tumorsuppressor-Proteins zu vermehrter Inflammation führen kann. Untersuchungen mit verschiedenen VEL im septischen Nierenversagen fehlen dazu bisher. Supavekin

et al. konnten in einer frühen Phase der renalen Ischämie mit anschließender Reperfusion am Mausmodell eine Herunterregulierung des P53-Gens mittels RT-PCR analysieren (Supavekin et al. 2003). Interessanterweise konnten, ähnlich den vorliegenden Ergebnissen, prädominant im Tubuli-interstitiellen Raum TUNEL-positive Einfärbungen erzielt werden, wohingegen die Glomeruli immunhistochemisch keine Apoptose aufwiesen.

C/EBP Im vorliegenden Experiment wurden Zeichen einer DIC und thrombotischen Mikroangiopathie im Rahmen des septischen akuten Nierenversagens präsent. Da weitere Aufschlüsse zu genauen molekularen Mechanismen der DIC notwenig sind (Slofstra et al. 2007), wurde in Anlehnung an Slofstras Ergebnisse der Transkriptionsfaktor C/EBP („CAAT/enhancer binding protein“) zur Untersuchung auf Genexpressionsebene im Sinne hypothesengetriebener Forschung ausgewählt. Dieses Protein wird zur Aufrechterhaltung der Zelldifferenzierung betrachtet (Wedel und Ziegler-Heitbrock, 1995). Nach heutigem Wissensstand sind sechs verschiedene Isoformen der CAAT/“enhancer“ bindenden Proteine bekannt, wobei die C-terminale Aminosäure-Sequenz bei allen C/EBP-Isoformen zu 90% identisch ist (Ramji und Foka 2002). Das Forscherteam um Slofstra fand in C/EBP-defizienten septischen Mäusen mit Endotoxin induzierter DIC ein vermindertes Auftreten von Nierenversagen mit Rückgang der systemischen Entzündung vor. Interessanterweise verbesserte sich nach Herunterregulierung des Transkriptionsfaktors die Nierenfunktion durch Rückgang der harnpflichtigen Stoffe Kreatinin und Harnstoff. Auf der Basis der vorliegenden histologischen Ergebnisse scheinen sich jedoch keine Verbesserungen im Nierengewebe bei Herunterregulierung dieses momentan noch relativ unbekannten Faktors unter HES-Behandlung einzustellen. Es muss darauf hingewiesen werden, dass in Slofstras Experiment die Isoform δ (delta) an Mäusen untersucht wurde. Im vorliegenden Experiment konnte als schweinespezifischer Primer aufgrund unzureichender Annotation hingegen nur die Isoform β (beta) getestet werden. Bei akuten Erkrankungen wie Sepsis und DIC spielt C/EBP vermutlich parallel an entzündlichen (Slofstra et al. 2007) und apoptotischen Wegen (Thangaraju et al. 2005) eine Rolle. So scheint die Induktion des Transkriptionsfaktors durch eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli, einschließlich IL1, IL6, Endotoxin und TNF α beschleunigt zu werden (Poli 1998). Demnach könnte im vorliegenden Experiment ein Zusammenhang zwischen der

Zytokininduktion unter Verwendung von 4% Gelatine- sowie Ringer-Azetat-Lösung und der vermehrten C/EBP-Expression bestehen. Eine erhöhte transkriptionelle Aktivität des C/EBP kann sowohl durch ihre modifizierte Expression als auch durch posttranskriptionelle Modifikationen wie Phosphorylierung (Buck et al. 1999) und Protein-Protein-Interaktion (LeClair et al. 1992) ausgelöst werden. Zudem konnte der Transkriptionsfaktor als wichtiger Vermittler proapoptotischer Genexpression nachgewiesen werden. In Epithelzellen der Brustdrüse gelang in C/EBP-defizienten Mäusen keine Aktivierung proapoptotischer Gencodierungen für, zum Beispiel P53, während antiapoptotische Gene nicht unterdrückt wurden (Thangaraju et al. 2005). Somit scheint C/EBP ein Haupt-Regulator proapoptotischer Genregulierungen bei der Einleitung des physiologischen Zelltodes zu sein (Thangaraju et al. 2005).

Im vorliegenden Experiment konnte im Gegensatz zur HES-Therapie unter der Therapie mit Ringer-Azetat und 4% Gelatine eine Induktion des Transkriptionsfaktors festgestellt werden, was demnach vermutlich als schützende Funktion vor Zelltod begründet werden kann. In anderen Experimenten wurde eine Abhängigkeit der C/EBP- β vermittelten Transaktivierung der N-terminalen Domäne von P53 beschrieben (Kubicka et al. 1999), indem P53 eine Hemmung der C/EBP- β vermittelten Gen-Transkription induziert (Webster et al. 1996) und somit die Regulierung der Zytokin-Synthese verändert und Zellproliferation verhindert (Margulies und Sehgal 1993, Wang et al. 1995, Kubicka et al. 1999). Im Experiment von Slofstra (2007) konnte bei reprimierter Genexpression von C/EBP eine unterschiedliche Wirkung im Gewebe festgestellt werden. Der schützende Effekt auf die Niere führte gleichzeitig zu einem schädigenden Effekt im Lebergewebe mit Anstieg der Stoffwechselenzyme ASAT (Aspartat-Aminotransferase) und ALAT (Alanin-Aminotransaminase), was weitere Aufklärungen zur nachweislichen Wirkung auf unterschiedliche Zelltypen und Organe erfordert. Da eine Beteiligung an der Expression einer Vielzahl von Genen in den unterschiedlichsten Geweben diskutiert wird, lässt sich der Transkriptionsfaktor noch nicht eindeutig einer bestimmten Signaltransduktionskaskade zuordnen. Die Modifikationen auf transkriptioneller Ebene können, müssen aber nicht zwingend eine Konsequenz auf Ebene der Proteine bewirken (Tomic et al. 2005). Selbst wenn beide Ebenen miteinander korrelieren, muss dieses Ergebnis weder eine kausale noch eine assoziativ korrekte Annahme, bezogen auf das eigentliche klinische Bild, erlauben (Oberbauer et al. 2007).

6 AUSBLICK

Zur Protektion bzw. Senkung der Letalität des Krankheitsbildes des ANV, das klinisch mit einer plötzlichen Verschlechterung der Nierenfunktion und dem Anstieg harnpflichtiger Substanzen im Blut einhergeht, bedarf es grundlegender pathophysiologischer Erkenntnisse und Therapiestrategien. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten entzündliche und apoptotische Auswirkungen verschiedener VEL auf die Niere infolge eines etablierten kombinierten Sepsismodells beschrieben werden. Insbesondere unter dem Volumenersatz mit 10% HES 200 ließen sich signifikante Unterschiede zur Kontroll-Lösung, aber auch zu anderen VEL darstellen. Hochmolekulares HES scheint zu einer gesteigerten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten sowie einem vermehrten apoptotischen Zelluntergang im Nierengewebe zu führen. Das könnte für eine ursächliche Korrelation inflammatorischer und apoptotischer Kaskaden im Sepsisgeschehen sprechen und repräsentiert einen weiteren möglichen Therapieansatz.

Neben der erwiesenen geringen Kreislaufwirkung scheint die Therapie mit 4% Gelatine zusätzlich zu Zellschäden beizutragen. Deren Einsatz sollte somit beschränkt werden. 6% HES 130 scheint nach den vorliegenden Untersuchungen bezüglich inflammatorischer und apoptotischer Prozesse geeigneter gegenüber 10% HES 200 als Volumenersatz in der Sepsistherapie zu sein. Für 10% HES 200/0,5 ist ein nierenschädlicher Substanzeffekt somit nicht auszuschließen, was bereits Zugang in öffentliche Beipackzettel gefunden hat. Letztlich tragen führende Hersteller von VEL den renalen Nebenwirkungen der Substanz insofern Rechnung, als das Gegenanzeigen für 6% HES 130/0,42 und 4% Gelatine-Lösung in Form von Nierenversagen bzw. Niereninsuffizienz angegeben werden.

Ferner könnte unter Verabreichung von 10% HES 200 das Auftreten fibrinreicher Mikrothromben sowie eine Störung der Fibrinpolymerisation kausal für Nierenversagen verantwortlich sein. Zur weitergehenden Erforschung der Gerinnungsstörungen aufgrund verschiedener VEL wird gegenwärtig in Folgestudien u.a. durch Blutproben derselben Schweine des vorliegenden „two-hit“-Modells an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie in Jena untersucht.

Aktuell liegen verschiedene Analysen zur Genexpression unterschiedlicher sepsisrelevanter Parameter vor, die sich aber derzeit nicht zu einem homogenen Gesamtbild zusammenfügen lassen. So wurden auch in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen molekularbiologisch konträre Ergebnisse unter HES-Applikation mit tendenziell unterdrückten inflammatorischen und apoptotischen Mediatoren festgestellt. Auf den ersten Blick scheinen die Ergebnisse im Vergleich zu den histologischen Ergebnissen widersprüchlich. Jedoch geben sie Hinweise dafür, dass beide HES-Lösungen im Gegensatz zu Gelatine infolge des verwendeten klinisch relevanten Sepsis-Modells nach 12 Stunden zu kaum merklichen Veränderungen auf Genexpressionsebene führen, aber durch noch ungeklärte biologische Komplexsysteme zu sichtbaren Schädigungen in der Zelle führen. Weitere Arbeiten sollten sich der Proteinebene widmen, z.B. durch Untersuchungen mittels Western-Blot, ELISA und Immunfluoreszenz, wobei man in Gewebematerial und Versuchsdauer nach Sepsisinduktion variieren sollte, um die Wirkung von HES besser zu verstehen. Neue Aspekte, die zur Pathogenese des septischen ANV beitragen, sind nur durch die Ermittlung und Validierung neuer Mediatoren, wie zum Beispiel des gegenwärtig noch verhältnismäßig unbekannten Faktors C/EBP, möglich. Wegweisend für weitere wichtige Erkenntnisse im Rahmen des septischen ANV infolge verschiedener Volumenersatztherapien könnte das Verhältnis nieren-spezifischer Parameter in Blut und Urin zur klinischen Symptomatik bzw. zu immunhistologischen und molekularbiologischen Analysen sowie die Untersuchung von kolloidalen HES-Lösungen als Triggerlösung für ANV sein. Die sich in der Diskussion befindlichen sekundären Maßnahmen, wie beispielsweise die Einhaltung bestimmter Dosierungen infolge HES-Applikation oder die Verwendung von TNF α -Antagonisten, sind derzeit lediglich experimentellen Charakters und weiteren klinischen Studien vorbehalten.

7 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Adams H. 2007. Volume and fluid replacement - Physiology, pathophysiology, pharmacology and clinical use (Part 1 und 2). *Anästh Intensivmed* 48:518-540.
- Adams HA, Piepenbrock S, Hempelmann G. 1998. Volume replacement solutions - pharmacology and clinical use. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 33 (1):2-17.
- Afford S, Randhawa S. 2000. Apoptosis. *Mol Pathol*, 53 (2):55-63.
- Aiboshi J, Moore EE, Ciesla DJ, Silliman CC. 2001. Blood transfusion and the two-insult model of post-injury multiple organ failure. *Shock*, 15 (4):302-306.
- Aken V, Reinhart K, Zimpfer M, Welte T. 2006. Sepsis und Septischer Schock. In: Aken V, Hrsg. *Intensivmedizin*. Zweite Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag, 847.
- Alpers CE. 2003. Light at the end of the TUNEL: HIV-associated thrombotic microangiopathy. *Kidney Int*, 63 (1):385-396.
- Altunkan A, Aydin O, Ozer Z, Colak T, Bilgin E, Oral U. 2002. Anti-apoptotic effect of succinyl gelatine in a liver ischaemia-reperfusion injury model (Bcl-2, Bax, Caspase 3)? *Pharmacol Res*, 45 (6):485-489.
- Angus DC, Wax RS. 2001. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med*, 29 (7 Suppl):109-116.
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. 2005. Septic shock. *Lancet*, 365 (9453):63-78.
- Aoyama M, Kotani J, Usami M. 2009. Gender difference in granulocyte dynamics and apoptosis and the role of IL-18 during endotoxin-induced systemic inflammation. *Shock*.
- Arfors KE, Buckley PB. 1989. Role of artificial colloids in rational fluid therapy. In: Tuma RF, White JV, Messmer K, Hrsg. *The role of hemodilution in optimal patient care*. München: Zuckerschwerdt, 100-123.
- Arief AI. 1999. Fatal postoperative pulmonary edema: pathogenesis and literature review. *Chest*, 115 (5):1371-1377.
- Auwerda JJ, Leebeek FW, Wilson JH, van Diggelen OP, Lam KH, Sonneveld P. 2006. Acquired lysosomal storage caused by frequent plasmapheresis procedures with hydroxyethyl starch. *Transfusion*, 46 (10):1705-1711.
- Badr KF, Kelley VE, Rennke HG, Brenner BM. 1986. Roles for thromboxane A2 and leukotrienes in endotoxin-induced acute renal failure. *Kidney Int*, 30 (4):474-480.
- Bagshaw SM, Bellomo R. 2006. Fluid resuscitation and the septic kidney. *Curr Opin Crit Care*, 12 (6):527-530.
- Bagshaw SM, Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Oudemans-van Straaten HM, Ronco C, Kellum JA. 2007. Septic acute kidney injury in critically ill patients: clinical characteristics and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2 (3):431-439.
- Bartels H. 1997. Acute renal failure. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd*, 114:185-187.
- Barth E, Bassi G, Maybauer DM, Simon F, Groger M, Oter S, Speit G, Nguyen CD, Hasel C, Moller P, Wachter U, Vogt JA, Matejovic M, Radermacher P, Calzia E. 2008. Effects of ventilation with 100% oxygen during early hyperdynamic porcine fecal peritonitis. *Crit Care Med*, 36 (2):495-503.
- Baumhoer D, Steinbrück I, Götz A. 2003. In: Baumhoer D, Hrsg. *Kurzlehrbuch Histologie*. Zweite Aufl. München: Urban & Fischer, 191
- Bellomo R, Wan L, Langenberg C, May C. 2008. Septic acute kidney injury: new concepts. *Nephron Exp Nephrol*, 109 (4):e95-100.
- Benninghoff A, Drenckhahn D. 2003. *Anatomie Band 1*. 16 Aufl. München: Urban & Fischer, 759-761.
- Blasco V, Leone M, Antonini F, Geissler A, Albanese J, Martin C. 2008. Comparison of the novel hydroxyethylstarch 130/0.4 and hydroxyethylstarch 200/0.6 in brain-dead donor resuscitation on renal function after transplantation. *Br J Anaesth*, 100 (4):504-508.

- Bloos F. 2008. Sepsis. In: Burchardi H et al, Hrsg. Die Intensivmedizin. Zehnte Aufl. Heidelberg: Springer-Verlag, 791-809.
- Bloos F, Hinder F, Becker K, Sachse S, Mekontso Dessap A, Straube E, Cattoir V, Brun-Buisson C, Reinhart K, Peters G, Bauer M. 2010. A multicenter trial to compare blood culture with polymerase chain reaction in severe human sepsis. *Intensive Care Med.* 2010, 36 (2):241-7.
- Bock HA. 1997. Pathogenesis of acute renal failure: new aspects. *Nephron*, 76 (2):130-142.
- Bock HA. 1998. Pathophysiology of acute renal failure in septic shock: from prerenal to renal failure. *Kidney Int Suppl*, 64:S15-18.
- Böcker W. 2008. Repetitorium Pathologie: Repetitorium zur vierten Auflage des großen Lehrbuchs Pathologie. Zweite Aufl. München: Urban & Fischer, 354.
- Boenisch T. 2006. Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden. Dritte Aufl. Hamburg: Dako, 30-41.
- Bohle A, Muller GA, Wehrmann M, Mackensen-Haen S, Xiao JC. 1996. Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies, and chronic interstitial nephritides. *Kidney Int Suppl*, 54:2-9.
- Boldt J, Brosch C, Rohm K, Papsdorf M, Mengistu A. 2008. Comparison of the effects of gelatin and a modern hydroxyethyl starch solution on renal function and inflammatory response in elderly cardiac surgery patients. *Br J Anaesth*, 100 (4):457-464.
- Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. 1997. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*, 112 (1):235-243.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101 (6):1644-1655.
- Bonegio R, Lieberthal W. 2002. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 11 (3):301-308.
- Bortner CD, Cidlowski JA. 2000. Volume regulation and ion transport during apoptosis. *Methods Enzymol*, 322:421-433.
- Brabant D. 2007. Molecular Biology of Sepsis: Identification and Characterization of Key Apoptotic Signalling Pathways. In: Miachael P, Kirwan T, Pickens CO, Hrsg. *Cell Apoptotic Signaling Pathways*. New York: Nova Publishers, 2.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303 (5663):1532-1535.
- Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B. 1995. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *Jama*, 274 (12):968-974.
- Brunkhorst FM. 2006. Epidemiology, economy and practice - results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet). *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 41 (1):43-44.
- Brunkhorst FM. 2007. Therapie des septischen Kreislaufversagens. *Ärztebl Thüringen*, 18 (7-8):418-422.
- Brunkhorst FM, Karzai W, Reinhart K. 2002. Diagnostic approach to sepsis - state of the art. *Zentralbl Chir*, 127 (3):165-173.
- Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, Moerer O, Gruendling M, Oppert M, Grond S, Olthoff D, Jaschinski U, John S, Rossaint R, Welte T, Schaefer M, Kern P, Kuhnt E, Kiehntopf M, Hartog C, Natanson C, Loeffler M, Reinhart K. 2008. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med*, 358 (2):125-139.
- Buck M, Poli V, van der Geer P, Chojkier M, Hunter T. 1999. Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha. *Mol Cell*, 4 (6):1087-1092.

- Burrows G. 1975. Haematologic alterations associated with acute *E. coli* endotoxemia. In: Kitchen H, Krebiel JD, Hrsg. Proc 1st Symp Equine Hematology, Golden Golo: American Association Equine Practitioners:505-515.
- Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol, 29 (1):23-39.
- Carden DL, Granger DN. 2000. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. J Pathol, 190 (3):255-266.
- Carlson RW. et al. 1990. Rattan S, Haupt M. Fluid resuscitation in conditions of increased permeability. Anesth Rev 17 (3):14.
- Castellheim A, Thorgersen EB, Hellerud BC, Pharo A, Johansen HT, Brosstad F, Gaustad P, Brun H, Fosse E, Tonnessen TI, Nielsen EW, Mollnes TE. 2008. New biomarkers in an acute model of live *Escherichia coli*-induced sepsis in pigs. Scand J Immunol, 68 (1):75-84.
- Chawla LS, Seneff MG, Nelson DR, Williams M, Levy H, Kimmel PL, Macias WL. 2007. Elevated plasma concentrations of IL-6 and elevated APACHE II score predict acute kidney injury in patients with severe sepsis. Clin J Am Soc Nephrol, 2 (1):22-30.
- Chertow GM, Levy EM, Hammermeister KE, Grover F, Daley J. 1998. Independent association between acute renal failure and mortality following cardiac surgery. Am J Med, 104 (4):343-348.
- Chinitz JL, Kim KE, Onesti G, Swartz C. 1971. Pathophysiology and prevention of dextran-40-induced anuria. J Lab Clin Med, 77 (1):76-87.
- Chung CS, Xu YX, Wang W, Chaudry IH, Ayala A. 1998. Is Fas ligand or endotoxin responsible for mucosal lymphocyte apoptosis in sepsis? Arch Surg, 133 (11):1213-1220.
- Churchill PC, Bidani AK, Schwartz MM. 1987. Renal effects of endotoxin in the male rat. Am J Physiol, 253 (2 Pt 2):244-250.
- Cittanova ML, Leblanc I, Legendre C, Mouquet C, Riou B, Coriat P. 1996. Effect of hydroxyethylstarch in brain-dead kidney donors on renal function in kidney-transplant recipients. Lancet, 348 (9042):1620-1622.
- Coalson JJ, Hinshaw LB, Guenter CA, Berrell EL, Greenfield LJ. 1975. Pathophysiologic responses of the subhuman primate in experimental septic shock. Lab Invest, 32 (4):561-569.
- Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. 1998. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. Clin Sci (Lond), 94 (5):461-471.
- Coronel B. 1996. Hydroxyethylstarch and osmotic nephrosis-like lesions in kidney transplants. Lancet, 348: 1595.
- Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. 2003. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. Immunol Rev, 193:10-21.
- Cunningham PN, Dyanov HM, Park P, Wang J, Newell KA, Quigg RJ. 2002. Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. J Immunol, 168 (11):5817-5823.
- D'Amico G, Bazzi C. 2003. Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage. Curr Opin Nephrol Hypertens, 12 (6):639-643.
- da Silva FM, Massart-Leen AM, Burvenich C. 1994. Development and maturation of neutrophils. Vet Q, 16 (4):220-225.
- Daemen MA, van de Ven MW, Heineman E, Buurman WA. 1999. Involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor- α in renal ischemia-reperfusion injury. Transplantation, 67 (6):792-800.
- Dagher PC. 2004. Apoptosis in ischemic renal injury: roles of GTP depletion and p53. Kidney Int, 66 (2):506-509.
- Dalmose AL, Hvistendahl JJ, Olsen LH, Eskild-Jensen A, Djurhuus JC, Swindle MM. 2000. Surgically induced urologic models in swine. J Invest Surg, 13 (3):133-145.
- Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, Lamy M. 1992. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. Ann Surg, 215 (4):356-362.

- Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J. 1994. Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods Cell Biol*, 41:15-38.
- Davidson IJ. 2006. Renal impact of fluid management with colloids: a comparative review. *Eur J Anaesthesiol*, 23 (9):721-738.
- Davidson IJ. 2009. Acute kidney injury by hydroxyethyl starch: Can the risks be mitigated? *Crit Care Med*, 37 (4):1499-1501.
- de Jonge E, Levi M. 2001. Effects of different plasma substitutes on blood coagulation: a comparative review. *Crit Care Med*, 29 (6):1261-1267.
- de Jonge HJ, Fehrman RS, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, Kamps WA, de Vries EG, van der Zee AG, te Meerman GJ, ter Elst A. 2007. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS ONE*, 2 (9):e898.
- de Mendonca A, Vincent JL, Suter PM, Moreno R, Dearden NM, Antonelli M, Takala J, Sprung C, Cantraine F. 2000. Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by the SOFA score. *Intensive Care Med*, 26 (7):915-921.
- Dehne MG, Muhling J, Sablotzki A, Papke G, Kuntzsch U, Hempelmann G. 1997. Effect of hydroxyethyl starch solution on kidney function in surgical intensive care patients. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 32 (6):348-354.
- Deitch EA, Shi HP, Feketeova E, Hauser CJ, Xu DZ. 2003. Hypertonic saline resuscitation limits neutrophil activation after trauma-hemorrhagic shock. *Shock*, 19 (4):328-333.
- Deitch EA. 2005. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock*, 1:19-23.
- Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL. 2008. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med*, 36 (1):296-327.
- Demian A, Peeters P, Sennesael J. 1999. Hydroxyethyl starch does not impair immediate renal function in kidney transplant recipients: a retrospective, multicentre analysis. *Nephrol Dial Transplant*, 14 (6):1517-1520.
- Dickenmann M, Oetli T, Mihatsch MJ. 2008. Osmotic nephrosis: acute kidney injury with accumulation of proximal tubular lysosomes due to administration of exogenous solutes. *Am J Kidney Dis*, 51 (3):491-503.
- Dieterich HJ, Unertl K. 1998. Volume substitution with colloids. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 33 (4):250.
- Dishart MK, Kellum JA. 2000. An evaluation of pharmacological strategies for the prevention and treatment of acute renal failure. *Drugs*, 59 (1):79-91.
- Dodds W. 1982. The Pig model for biomedical research. *FedProc*, 41:247-256.
- Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR. 1999. Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*, 277 (3 Pt 2):R922-929.
- Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA. 2003. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol*, 199 (2):221-228.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 68:383-424.
- Echtenacher B, Freudenberg MA, Jack RS, Mannel DN. 2001. Differences in innate defense mechanisms in endotoxemia and polymicrobial septic peritonitis. *Infect Immun*, 69 (12):7271-7276.
- Eichhorn V. et al. 2006. Volumenersatztherapie - Pharmakotherapie Intensivmedizin up2date, 2 DOI 10.1055.
- Eissner B, Matz K, Smorodchenko A, Roschmann A, v Specht BU. 2002. Chronic porcine two-hit model with hemorrhagic shock and *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *Eur Surg Res*, 34 (1-2):61-67.

- Elbim C, Bailly S, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA. 1994. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect Immun*, 62 (6):2195-2201.
- Erkens T, Van Poucke M, Vandesompele J, Goossens K, Van Zeveren A, Peelman LJ. 2006. Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with PPARGC1A. *BMC Biotechnol*, 6:41.
- Etschmann B, Wilcken B, Stoevesand K, von der Schulenburg A, Sterner-Kock A. 2006. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in canine mammary tumors using the GeNorm algorithm. *Vet Pathol*, 43 (6):934-942.
- Fan J, Char D, Kolasa AJ, Pan W, Maitra SR, Patlak CS, Spolarics Z, Gelato MC, Lang CH. 1995. Alterations in hepatic production and peripheral clearance of IGF-I after endotoxin. *Am J Physiol*, 269 (1 Pt 1):E33-42.
- Fearon DT, Locksley RM. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272 (5258):50-53.
- Feng X, Yan W, Wang Z, Liu J, Yu M, Zhu S, Xu J. 2007. Hydroxyethyl starch, but not modified fluid gelatin, affects inflammatory response in a rat model of polymicrobial sepsis with capillary leakage. *Anesth Analg*, 104 (3):624-630.
- Fink MP. 2008. Animal models of sepsis and its complications. *Kidney Int*, 74 (8):991-993.
- Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 10 (1):76-100.
- Fleige S, Pfaffl MW. 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*, 27 (2-3):126-139.
- Forbes CD, Jackson WF. 2008. Farbatlas der inneren Medizin. Erste Aufl. München: Urban & Fischer, 134.
- Forster H, Lehmann G, Asskali F. 2001. The *in vivo* molecular weight and renal threshold of hydroxyethyl starch in the example of molar substituted HES70/0/5. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 36 (1):31-37.
- Fujishima S, Aikawa N. 1995. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Intensive Care Med*, 21 (3):277-285.
- Gee AP. 1984. Advantages and limitations of methods for measuring cellular chemotaxis and chemokinesis. *Mol Cell Biochem*, 62 (1):5-11.
- Gill C, Mestrlil R, Samali A. 2002. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease - a novel therapeutic target? *Faseb J*, 16 (2):135-146.
- Gillum DM, Brennan S. 1992. Acute renal failure. In: Schmidt GA, Wood LDH, Hall JB, Hrsg. *Principles of Critical Care*:1899-1912.
- Ginz H, Gottschall V, Schwarzkopf G, Walter K. 1998. Exzessive Gewebespeicherung von Kolloiden im retikuloendothelialen System. *Der Anästhesist*, 47:330-334.
- Gomori G. 1955. Histochemistry of human esterases. *J Histochem Cytochem*, 3 (6):479-484.
- Gopal I, Bhonagiri S, Ronco C, Bellomo R. 1997. Out of hospital outcome and quality of life in survivors of combined acute multiple organ and renal failure treated with continuous venovenous hemofiltration/hemodiafiltration. *Intensive Care Med*, 23 (7):766-772.
- Gramm HJ. 1995. Sepsis: ein Begriff im Wandel. Möglichkeiten und Grenzen anhand klinischer Kriterien. *Dtsch Med Wochenschr*, 120:498-502.
- Grimminger F, Mayer K, Seeger W. 1997. Is there a reliable immunotherapy in infection? *Internist Berl*, 38 (6):541-552.
- Groeneveld AB. 2000. Albumin and artificial colloids in fluid management: where does the clinical evidence of their utility stand? *Crit Care*, 4 Suppl 2:S16-20.
- Groeneveld AB, Tran DD, van der Meulen J, Nauta JJ, Thijs LG. 1991. Acute renal failure in the medical intensive care unit: predisposing, complicating factors and outcome. *Nephron*, 59 (4):602-610.

- Guba M, Steinbauer M, Buchner M, Frolich D, Farkas S, Jauch KW, Anthuber M. 2000. Differential effects of short-term ace- and AT1-receptor inhibition on postischemic injury and leukocyte adherence *in vivo* and *in vitro*. *Shock*, 13 (3):190-196.
- Guo R, Wang Y, Minto AW, Quigg RJ, Cunningham PN. 2004. Acute renal failure in endotoxemia is dependent on caspase activation. *J Am Soc Nephrol*, 15 (12):3093-3102.
- Guvén H, Altıntop L, Baydin A, Esen S, Aygun D, Hokelek M, Doganay Z, Bek Y. 2002. Diagnostic value of procalcitonin levels as an early indicator of sepsis. *Am J Emerg Med*, 20 (3):202-206.
- Haas T, Preinreich A, Oswald E, Pajk W, Berger J, Kuehbacher G, Innerhofer P. 2007. Effects of albumin 5% and artificial colloids on clot formation in small infants. *Anaesthesia*, 62 (10):1000-1007.
- Haljamae H. 1999. Does prehospital hypertonic infusion therapy improve the survival of trauma patients? *Lakartidningen*, 96 (9):1014-1017.
- Hauet T, Faure JP, Baumert H, Bardou A, Gibelin H, Beguinot S, Germonville T, Hebrard W, Choulet P, Carretier M, Eugene M. 1998. Influence of different colloids on hemodynamic and renal functions: comparative study in an isolated perfused pig kidney model. *Transplant Proc*, 30 (6):2796-2797.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6 (10):986-994.
- Heinzelmann M, Mercer-Jones MA, Passmore JC. 1999. Neutrophils and renal failure. *Am J Kidney Dis*, 34 (2):384-399.
- Herrath DV, Thimme W. 1990. Plasmaersatzmittel. *Der Arzneimittelbrief* 24:9-12.
- Heumann D, Le Roy D, Zanetti G, Eugster HP, Ryffel B, Hahne M, Tschopp J, Glauser MP. 1995. Contribution of TNF/TNF receptor and of Fas ligand to toxicity in murine models of endotoxemia and bacterial peritonitis. *J Inflamm*, 47 (4):173-179.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10 (4):413-417.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11 (9):1026-1030.
- Hill MS, Ruiz A, Gomez LM, Miller JM, Berman NE, Stephens EB. 2007. APOBEC3G expression is restricted to epithelial cells of the proximal convoluted tubules and is not expressed in the glomeruli of macaques. *J Histochem Cytochem*, 55 (1):63-70.
- Hill SL, Elings VB, Lewis FR: Changes in lung water and capillary permeability following sepsis and fluid overload. *J Surg Res* 1980; 28: 140-150.
- Hiramatsu M, Hotchkiss RS, Karl IE, Buchman TG. 1997. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock*, 7 (4):247-253.
- Hirano ES, Mantovani M, Morandin RC, Brito J, Pavani L. 2006. Total hepatic ischemia and reperfusion after state controlled hemorrhagic shock, with used of different solutions: effects of neutrophils sequestration in kidney of rats. *Acta Cir Bras*, 21 (1):31-37.
- Hofbauer R, Moser D, Hornykewycz S, Frass M, Kapiotis S. 1999. Hydroxyethyl starch reduces the chemotaxis of white cells through endothelial cell monolayers. *Transfusion*, 39 (3):289-294.
- Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348 (2):138-150.
- Hotchkiss RS, Nicholson DW. 2006. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*, 6 (11):813-822.
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, Jacobson A, Buchman TG, Karl IE. 1997. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med*, 25 (8):1298-1307.

- Hueter L, Simon TP, Weinmann L, Schuerholz T, Reinhart K, Wolf G, Amann KU, Marx G. 2009. Hydroxyethylstarch impairs renal function and induces interstitial proliferation, macrophage infiltration and tubular damage in an isolated renal perfusion model. *Crit Care*, 13 (1):R23.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*, 6 (4):279-284.
- Innerhofer P, Fries D, Margreiter J, Klingler A, Kuhbacher G, Wachter B, Oswald E, Salner E, Frischhut B, Schobersberger W. 2002. The effects of perioperatively administered colloids and crystalloids on primary platelet-mediated hemostasis and clot formation. *Anesth Analg*, 95 (4):858-865, table of contents.
- Ivanyi B, Olsen TS. 1991. Immunohistochemical identification of tubular segments in percutaneous renal biopsies. *Histochemistry*, 95 (4):351-356.
- Jacob M, Chappell D, Conzen P, Wilkes MM, Becker BF, Rehm M. 2008. Small-volume resuscitation with hyperoncotic albumin: a systematic review of randomized clinical trials. *Crit Care*, 12 (2):R34.
- Jersmann HP, Rathjen DA, Ferrante A. 1998. Enhancement of lipopolysaccharide-induced neutrophil oxygen radical production by tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*, 66 (4):1744-1747.
- Jocks T. 1997. Häodynamische und immunologische Veränderungen bei einer immunvermittelten Glomerulopathie. Untersuchungen an der *ex vivo* isoliert perfundierten Rattenniere. Hamburg: Verlag Dr. Kovac.
- Kang PM, Izumo S. 2000. Apoptosis in heart failure: is there light at the end of the tunnel (TUNEL)? *J Card Fail*, 6 (1):43-46.
- Karow T, Lang-Roth 2006. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Köln: Ruth/Karow, 451.
- Keel M, Ungethum U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, Ertel W. 1997. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood*, 90 (9):3356-3363.
- Kellum JA. 2008. Acute kidney injury. *Crit Care Med*, 36 (4 Suppl):S141-145.
- Kellum JA, Angus DC. 2002. Patients are dying of acute renal failure. *Crit Care Med*, 30 (9):2156-2157.
- Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC. 2003. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284 (5):C1309-1318.
- Kikeri D, Pennell JP, Hwang KH, Jacob AI, Richman AV, Bourgoignie JJ. 1986. Endotoxemic acute renal failure in awake rats. *Am J Physiol*, 250 (6 Pt 2):F1098-1106.
- Kimme P, Jannsen B, Ledin T, Gupta A, Vegfors M. 2001. High incidence of pruritus after large doses of hydroxyethyl starch (HES) infusions. *Acta Anaesthesiol Scand*, 45 (6):686-689.
- Kindt N, Menzebach A, Van de Wouwer M, Betz I, De Vriese A, Conway EM. 2008. Protective role of the inhibitor of apoptosis protein, survivin, in toxin-induced acute renal failure. *Faseb J*, 22 (2):510-521.
- Knotzer H, Pajk W, Maier S, Dunser MW, Ulmer H, Schwarz B, Salak N, Hasibeder WR. 2006. Comparison of lactated Ringer's, gelatine and blood resuscitation on intestinal oxygen supply and mucosal tissue oxygen tension in haemorrhagic shock. *Br J Anaesth*, 97 (4):509-516.
- Komarova EA, Krivokrysenko V, Wang K, Neznanov N, Chernov MV, Komarov PG, Brennan ML, Golovkina TV, Rokhlin OW, Kuprash DV, Nedospasov SA, Hazen SL, Feinstein E, Gudkov AV. 2005. p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. *Faseb J*, 19 (8):1030-1032.
- Krautzig S. 2000. Niere In: Braun J, Renz-Polster H, Hrsg. Basislehrbuch Innere Medizin, Zweite Aufl. München: Urban & Fischer, 840-913.

- Kubicka S, Kuhnel F, Zender L, Rudolph KL, Plumpe J, Manns M, Trautwein C. 1999. p53 represses CAAT enhancer-binding protein (C/EBP)-dependent transcription of the albumin gene. A molecular mechanism involved in viral liver infection with implications for hepatocarcinogenesis. *J Biol Chem*, 274 (45):32137-32144.
- Kuhlmann U, Walb D, Böhler J, Luft F. 2008. Nephrologie. Pathophysiologie - Klinik - Nierenersatzverfahren. Fünfte überarbeitete Aufl. Stuttgart. New York: Thieme-Verlag, 362-411.
- Kumar BD, Prasad CE, Krishnaswamy K. 1992. Detection of rifampicin-induced nephrotoxicity by N-acetyl-3-D-glucosaminidase activity. *J Trop Med Hyg*, 95 (6):424-427.
- Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. 1998. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem*, 46 (3):327-334.
- Lacy P, Eitzen G. 2008. Control of granule exocytosis in neutrophils. *Front Biosci*, 13:5559-5570.
- Lang K, Boldt J, Suttner S, Haisch G. 2001. Colloids versus crystalloids and tissue oxygen tension in patients undergoing major abdominal surgery. *Anesth Analg*, 93 (2):405-409, 403rd contents page.
- Lang K, Suttner S, Boldt J, Kumle B, Nagel D. 2003. Volume replacement with HES 130/0.4 may reduce the inflammatory response in patients undergoing major abdominal surgery. *Can J Anaesth*, 50 (10):1009-1016.
- Langenberg C, Bagshaw SM, May CN, Bellomo R. 2008. The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review. *Crit Care*, 12 (2):R38.
- Laubenthal H, Sirtl C. 1998. HES, dextran and gelatin - indications and tolerance. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 33 (4):251-255.
- Laxenaire MC, Charpentier C, Feldman L. 1994. Anaphylactoid reactions to colloid plasma substitutes: incidence, risk factors, mechanisms. A French multicenter prospective study. *Ann Fr Anesth Reanim*, 13 (3):301-310.
- LeClair KP, Blonar MA, Sharp PA. 1992. The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (17):8145-8149.
- Leder LD. 1970. Acute myelo-monocytic leukemia with atypical naphthol-AS-D-chloracetate esterase positive eosinophils. *Acta Haematol*, 44 (1):52-62.
- Lee CC, Chang IJ, Yen ZS, Hsu CY, Chen SY, Su CP, Chiang WC, Chen SC, Chen WJ. 2005. Effect of different resuscitation fluids on cytokine response in a rat model of hemorrhagic shock. *Shock*, 24 (2):177-181.
- Lee LG, Connell CR, Bloch W. 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*, 21 (16):3761-3766.
- Legendre C, Thervet E, Page B, Percheron A, Noel LH, Kreis H. 1993. Hydroxyethyl-starch and osmotic-nephrosis-like lesions in kidney transplantation. *Lancet*, 342 (8865):248-249.
- Lenz K, Schimetta W, Polz W, Kroll W, Gruy-Kapral C, Magometschnigg D. 2000. Intestinal elimination of hydroxyethyl starch? *Intensive Care Med*, 26 (6):733-739.
- Levi M, de Jonge E, van der Poll T, ten Cate H. 1999. Disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*, 82 (2):695-705.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*, 31 (4):1250-1256.
- Li D, Ren BH, Shen Y, Wu H, Wang C, Zhang L, Zhu J, Jing H. 2007. A Swine model for long-term evaluation of prosthetic heart valves. *ANZ J Surg*, 77 (8):654-658.
- Lipsky RH, Mazzanti CM, Rudolph JG, Xu K, Vyas G, Bozak D, Radcl MQ, Goldman D. 2001. DNA melting analysis for detection of single nucleotide polymorphisms. *Clin Chem*, 47 (4):635-644.
- Liu SF, Malik AB. 2006. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290 (4):L622-L645.

- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 4 (6):357-362.
- Lockey C, Otto E, Long Z. 1998. Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. *Biotechniques*, 24 (5):744-746.
- Lodes U. 2008. Sepsisdiagnostik chirurgischer Intensivpatienten mit dem "Lightcycler" Septifast-Test. [Meeting Abstract DGCH].
- Loer D, Elsner J, Michalsen A, Melchart D, Volker K, Dobos G. 1999. Hyperthermia-induced priming effect in neutrophil granulocytes. *Forsch Komplementarmed*, 6 (2):86-88.
- Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. 1999. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity*, 10 (6):629-639.
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362 (6423):847-849.
- Lv R, Zhou ZQ, Wu HW, Jin Y, Zhou W, Xu JG. 2006. Hydroxyethyl starch exhibits antiinflammatory effects in the intestines of endotoxemic rats. *Anesth Analg*, 103 (1):149-155, table of contents.
- Macias CA, Kameneva MV, Tenhunen JJ, Puyana JC, Fink MP. 2004. Survival in a rat model of lethal hemorrhagic shock is prolonged following resuscitation with a small volume of a solution containing a drag-reducing polymer derived from aloe vera. *Shock*, 22 (2):151-156.
- Mahmood A, Gosling P, Vohra RK. 2007. Randomized clinical trial comparing the effects on renal function of hydroxyethyl starch or gelatine during aortic aneurysm surgery. *Br J Surg*, 94 (4):427-433.
- Mailloux L, Swartz CD, Capizzi R, Kim KE, Onesti G, Ramirez O, Brest AN. 1967. Acute renal failure after administration of low-molecular weight dextran. *N Engl J Med*, 277 (21):1113-1118.
- Majno G, Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146 (1):3-15.
- Mardel SN, Saunders F, Ollerenshaw L, Edwards C, Baddeley D. 1996. Reduced quality of *in vitro* clot formation with gelatin-based plasma substitutes. *Lancet*, 347 (9004):825.
- Margulies L, Sehgal PB. 1993. Modulation of the human interleukin-6 promoter (IL-6) and transcription factor C/EBP beta (NF-IL6) activity by p53 species. *J Biol Chem*, 268 (20):15096-15100.
- Marx G. 2009. Yearbook of intensive care and Emergency Medicine. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 243-253.
- Marx G. 2003. Fluid therapy in sepsis with capillary leakage. *Eur J Anaesthesiol*, 20 (6):429-442.
- Marx G, Schuerholz T, Reinhart K. 2005. New approaches to intensive care for sepsis. *Chirurg*, 76 (9):845-855.
- Marx G, Cobas Meyer M, Schuerholz T, Vangerow B, Gratz KF, Hecker H, Sumpelmann R, Rueckoldt H, Leuwer M. 2002. Hydroxyethyl starch and modified fluid gelatin maintain plasma volume in a porcine model of septic shock with capillary leakage. *Intensive Care Med*, 28 (5):629-635.
- Matejovic M, Radermacher P, Joannidis M. 2007. Acute kidney injury in sepsis: is renal blood flow more than just an innocent bystander? *Intensive Care Med*, 33 (9):1498-1500.
- McPhail LC, Harvath ES. 1994. Signal transduction in neutrophil oxidative metabolism and chemotaxis. In: Abramson JS, Wheeler JG, Hrsg. *The Neutrophil* IRL Press at Oxford University Press:63-91.
- Meisel C. 2006. Pathophysiologie und Immunologisches Monitoring der Sepsis. In: U Sack et al, Hrsg. *Zelluläre Diagnostik*. Basel: Karger-Verlag.
- Meissner M. 2005. Gibt es neue Marker zur Sepsisfrüherkennung? In: *chirurg Praxis* 64, Hans Marseille Verlag GmbH München:403-418.

- Meldrum KK, Meldrum DR, Hile KL, Yerkes EB, Ayala A, Cain MP, Rink RC, Casale AJ, Kaefer MA. 2001. p38 MAPK mediates renal tubular cell TNF-alpha production and TNF-alpha-dependent apoptosis during simulated ischemia. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281 (2):C563-570.
- Messaris E, Memos N, Chatzigianni E, Kataki A, Nikolopoulou M, Manouras A, Albanopoulos K, Konstadoulakis MM, Bramis J. 2008. Apoptotic death of renal tubular cells in experimental sepsis. *Surg Infect (Larchmt)*, 9 (3):377-388.
- Messmer UK, Briner VA, Pfeilschifter J. 1999. Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int*, 55 (6):2322-2337.
- Messmer UK, Briner VA, Pfeilschifter J. 2000. Basic fibroblast growth factor selectively enhances TNF-alpha-induced apoptotic cell death in glomerular endothelial cells: effects on apoptotic signaling pathways. *J Am Soc Nephrol*, 11 (12):2199-2211.
- Metnitz PG, Krenn CG, Steltzer H, Lang T, Ploder J, Lenz K, Le Gall JR, Druml W. 2002. Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients. *Crit Care Med*, 30 (9):2051-2058.
- Meyer TA, Wang J, Tiao GM, Ogle CK, Fischer JE, Hasselgren PO. 1995. Sepsis and endotoxemia stimulate intestinal interleukin-6 production. *Surgery*, 118 (2):336-342.
- Mims C, Cedric A, Dockrell HM, Goering RV, Roitt I, Wakelin D, Zuckermann M. 2006. *Medizinische Mikrobiologie Infektiologie*. Zweite Aufl. München: Urban & Fischer, 76-93.
- Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, Star RA. 2003. Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice. *Kidney Int*, 64 (5):1620-1631.
- Modarai B, Burnand KG, Humphries J, Waltham M, Smith A. 2005. The role of neovascularisation in the resolution of venous thrombus. *Thromb Haemost*, 93 (5):801-809.
- Molitoris BA. 1991. Ischemia-induced loss of epithelial polarity: potential role of the actin cytoskeleton. *Am J Physiol*, 260 (6 Pt 2):F769-778.
- Moloney WC, McPherson K, Fliegelman L. 1960. Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. *J Histochem Cytochem*, 8:200-207.
- Moran M, Kapsner C. 1987. Acute renal failure associated with elevated plasma oncotic pressure. *N Engl J Med*, 317 (3):150-153.
- Morgera S, Kraft AK, Siebert G, Luft FC, Neumayer HH. 2002. Long-term outcomes in acute renal failure patients treated with continuous renal replacement therapies. *Am J Kidney Dis*, 40 (2):275-279.
- Muenzer JT, Davis CG, Dunne BS, Unsinger J, Dunne WM, Hotchkiss RS. 2006. Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant "two-hit" model of sepsis. *Shock*, 26 (6):565-570.
- Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F. 1998. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother*, 52 (6):252-258.
- Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E. 1996. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem*, 44 (9):959-968.
- Neumann J. 2008. *Immunbiologie: Eine Einführung*. Zweite Aufl. Heidelberg: Springer-Verlag, 137-166.
- Newton K, Strasser A. 2003. Caspases signal not only apoptosis but also antigen-induced activation in cells of the immune system. *Genes Dev*, 17 (7):819-825.
- Nissenson AR. 1998. Acute renal failure: definition and pathogenesis. *Kidney Int Suppl*, 66:S7-10.

- Nohe B, Burchard M, Zanke C, Eichner M, Krump-Konvalinkova V, Kirkpatrick CJ, Dieterich HJ. 2002. Endothelial accumulation of hydroxyethyl starch and functional consequences on leukocyte-endothelial interactions. *Eur Surg Res*, 34 (5):364-372.
- Oberbauer R. 2007. Systembiologie in der Nephrologie. In: Meyer B, Lukas A, Rudnicki M, Mayer G, Kainz A, Schwarz C, Oberbauer R, Hrsg. *Nephro Skript - Interdisziplinäre Fortbildungsreihe der Österreichischen Gesellschaft für Nephrologie (OGN)*. Zehnter Jahrgang. Med Media Medical Opinion Network, Nr.4.
- Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. 2001a. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *Faseb J*, 15 (6):879-892.
- Oberholzer C, Oberholzer A, Bahjat FR, Minter RM, Tannahill CL, Abouhamze A, La-Face D, Hutchins B, Clare-Salzler MJ, Moldawer LL. 2001b. Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (20):11503-11508.
- Oppert M, Engel C, Brunkhorst FM, Bogatsch H, Reinhart K, Frei U, Eckardt KU, Loeffler M, John S. 2008. Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock - a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study. *Nephrol Dial Transplant*, 23 (3):904-909.
- Ortiz A, Lorz C, Catalan MP, Danoff TM, Yamasaki Y, Egido J, Neilson EG. 2000. Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure. *Kidney Int*, 57 (3):969-981.
- Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. 2006. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol*, 177 (3):1967-1974.
- Ottosson J, Dawidson I, Brandberg A, Idvall J, Sandor Z. 1991. Cardiac output and organ blood flow in experimental septic shock: effect of treatment with antibiotics, corticosteroids, and fluid infusion. *Circ Shock*, 35 (1):14-24.
- Peralta Soler A, Mullin JM, Knudsen KA, Marano CW. 1996. Tissue remodeling during tumor necrosis factor-induced apoptosis in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Am J Physiol*, 270 (5 Pt 2):F869-879.
- Perfettini JL, Kroemer G. 2003. Caspase activation is not death. *Nat Immunol*, 4 (4):308-310.
- Perl M, Chung CS, Perl U, Biffl WL, Cioffi WG, Ayala A. 2007. Beneficial versus detrimental effects of neutrophils are determined by the nature of the insult. *J Am Coll Surg*, 204 (5):840-852; discussion 852-843.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Pietila J, He Q, Oksi J, Viljanen MK. 2000. Rapid differentiation of *Borrelia garinii* from *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by LightCycler fluorescence melting curve analysis of a PCR product of the recA gene. *J Clin Microbiol*, 38 (7):2756-2759.
- Plante GE, Chakir M, Lehoux S, Lortie M. 1995. Disorders of body fluid balance: a new look into the mechanisms of disease. *Can J Cardiol*, 11 (9):788-802.
- Poli V. 1998. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem*, 273 (45):29279-29282.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, 389 (6648):300-305.
- Power CP, Wang JH, Manning B, Kell MR, Aherne NJ, Wu QD, Redmond HP. 2004. Bacterial lipoprotein delays apoptosis in human neutrophils through inhibition of caspase-3 activity: regulatory roles for CD14 and TLR-2. *J Immunol*, 173 (8):5229-5237.
- Prochazkova J, Kylarova D, Vranka P, Lichnovsky V. 2003. Comparative study of apoptosis-detecting techniques: TUNEL, apostain, and lamin B. *Biotechniques*, 35 (3):528-534.
- Ramesh G, Reeves WB. 2002. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest*, 110 (6):835-842.

- Ramji DP, Foka P. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*, 365 (Pt 3):561-575.
- Reimann S. et al. 2000. Hydroxyethylstärke-Speicherung in der Haut unter besonderer Berücksichtigung des Hydroxyethylstärke-assoziierten Juckreizes. *Dtsch med Wochenschr*, 125:280-285.
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Gerlach H, Grundling M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A, Peckelsen C, Putensen C, Stuber F, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Weiler N, Welte T, Werdan K. 2006. Diagnosis and therapy of sepsis. *Clin Res Cardiol*, 95 (8):429-454.
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, Moerer O, Gruendling M, Oppert M, Grond S, Olthoff D, Jaschinski U, John S, Rossaint R, Welte T, Schaefer M, Kern P, Kuhnt E, Kiehntopf M, Deufel T, Hartog C, Gerlach H, Stuber F, Volk HD, Quintel M, Loeffler M. 2008. Study protocol of the VISEP study. Response of the SepNet study group. *Anaesthesia*, 57 (7):723-728.
- Richman AV, Gerber LI, Balis JU. 1980. Peritubular capillaries. A major target site of endotoxin-induced vascular injury in the primate kidney. *Lab Invest*, 43 (4):327-332.
- Richman AV, Okulski EG, Balis JU. 1981. New Concepts in the pathogenesis of acute tubular necrosis associated with sepsis. *Ann Clin Lab Sci*, 11 (3):211-219.
- Riede UN. 2004. In: Werner M, Schaefer HE, Riede UN, Hrsg. *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Fünfte Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag, 36.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 245 (2):154-160.
- Risdon RA, Sloper JC, De Wardener HE. 1968. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet*, 2 (7564):363-366.
- Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M. 2001. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 345 (19):1368-1377.
- Roehe R, Plastow GS, Knap PW. 2003. Quantitative and molecular genetic determination of protein and fat deposition. *Homo*, 54 (2):119-131.
- Rüter A. 2004. *Unfallchirurgie*. Zweite Aufl. München: Urban & Fischer, 9-11.
- Sakr Y, Payen D, Reinhart K, Sipmann FS, Zavala E, Bewley J, Marx G, Vincent JL. 2007. Effects of hydroxyethyl starch administration on renal function in critically ill patients. *Br J Anaesth*, 98 (2):216-224.
- Saloga J. et al. 2006. *Allergologie-Handbuch: Grundlagen und klinische Praxis*. In: Klimmek L, Buhl R, Mann W, Knop J, Hrsg. Stuttgart: Schattauer Verlag, 96.
- Sano K, Fujigaki Y, Miyaji T, Ikegaya N, Ohishi K, Yonemura K, Hishida A. 2000. Role of apoptosis in uranyl acetate-induced acute renal failure and acquired resistance to uranyl acetate. *Kidney Int*, 57 (4):1560-1570.
- Saraste A. 1999. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz*, 24 (3):189-195.
- Sasse KC, Nauenberg E, Long A, Anton B, Tucker HJ, Hu TW. 1995. Long-term survival after intensive care unit admission with sepsis. *Crit Care Med*, 23 (6):1040-1047.
- Savill J. 1997. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*, 61 (4):375-380.
- Savill J, Fadok V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407 (6805):784-788.
- Schaper J, Ahmed R, Schafer T, Elster A, Enigk F, Habazettl H, Mousa S, Schafer M, Welte M. 2008. Volume therapy with colloid solutions preserves intestinal microvascular perfusion in endotoxaemia. *Resuscitation*, 76 (1):120-128.
- Schelling G, Haller M. 2000. Akutes Nierenversagen: Pathophysiologie - klinische Beurteilung - Therapie. *Der Anästhesist*, 49 (4):249.
- Schiebler T. et al. 1999. *Baucheingeweide*. In: Schmidt W, Zilles K, Hrsg. *Anatomie*. Achte Aufl. Heidelberg: Springer-Verlag, 545-613.

- Schindler R. et al. 2008. Akutes Nierenversagen und extrakorporale Eliminationsverfahren. In: Larsen R, Kuhlen R, Jauch KW, Schölmerich J, Burchardi H, Hrsg. Die Intensivmedizin. Zehnte Aufl. Heidelberg: Springer-Verlag, 755-770.
- Schlag G, Redel HR. 1998. Non-Human Primate Models of Sepsis. Zeitschrift Sepsis, Berlin: Springer-Netherlands-Verlag, 2(3):243-253.
- Schmidt C, Hocherl K, Bucher M. 2007. Cytokine-mediated regulation of urea transporters during experimental endotoxemia. Am J Physiol Renal Physiol, 292 (5):F1479-1489.
- Schmidt R, Thews G. 2000. In: Schmidt RF, Thews G, Hrsg. Physiologie des Menschen. 28 Aufl. Heidelberg, New York: Springer-Verlag:737-771.
- Schortgen F, Girou E, Deye N, Brochard L. 2008. The risk associated with hyperoncotic colloids in patients with shock. Intensive Care Med, 34 (12):2157-2168.
- Schortgen F, Lacherade JC, Bruneel F, Cattaneo I, Hemery F, Lemaire F, Brochard L. 2001. Effects of hydroxyethylstarch and gelatin on renal function in severe sepsis: a multicentre randomised study. Lancet, 357 (9260):911-916.
- Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. 2004. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. J Clin Invest, 114 (1):5-14.
- Schuerholz T, Sumpelmann R, Piepenbrock S, Leuwer M, Marx G. 2004. Ringer's solution but not hydroxyethyl starch or modified fluid gelatin enhances platelet microvesicle formation in a porcine model of septic shock. Br J Anaesth, 92 (5):716-721.
- Schulz KF, Grimes DA. 2002. Blinding in randomised trials: hiding who got what. Lancet. 2002 Feb 23; 359 (9307):696-700.
- Schwartz LM, Osborne BA. 1993. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. Immunol Today, 14 (12):582-590.
- Schwarzacher SP. 2002. Das Endothel: parakrine und endokrine Funktionen. Journal für Kardiologie, 9 (4):121-124.
- Segeer S, Eitner F, Cui Y, Hudkins KL, Alpers CE. 2002. Cellular injury associated with renal thrombotic microangiopathy in human immunodeficiency virus-infected macaques. J Am Soc Nephrol, 13 (2):370-378.
- Serumwerk. Bernburg AG 2004. Kolloidaler Volumenersatz aus Bernburg [Broschüre]. 19-24.
- Shi SR, Imam SA, Young L, Cote RJ, Taylor CR. 1995. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. J Histochem Cytochem, 43 (2):193-201.
- Siegenthaler W. 2005. Siegenthalers Differenzialdiagnose. 19 Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag, 863.
- Siegenthaler W. 2006a. Klinische Pathophysiologie. Achte Aufl. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag, 688.
- Siegenthaler W. 2006b. Immunsystem. In: Siegenthaler W, Blum HE, Hrsg. Klinische Pathophysiologie. Neunte Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag, 531-534.
- Siegenthaler W. 2006c. Niere und ableitende Harnwege. In: Siegenthaler W, Blum HE, Hrsg. Klinische Pathophysiologie. Neunte Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag, 916-957.
- Silva FG, Nadasdy T, Laszik Z. 1993. Immunohistochemical and lectin dissection of the human nephron in health and disease. Arch Pathol Lab Med, 117 (12):1233-1239.
- Simmons EM, Himmelfarb J, Sezer MT, Chertow GM, Mehta RL, Paganini EP, Soroko S, Freedman S, Becker K, Spratt D, Shyr Y, Ikizler TA. 2004. Plasma cytokine levels predict mortality in patients with acute renal failure. Kidney Int, 65 (4):1357-1365.
- Sirtl C, Laubenthal H, Zumbel V, Kraft D, Jurecka W. 1999. Tissue deposits of hydroxyethyl starch (HES): dose-dependent and time-related. Br J Anaesth, 82 (4):510-515.

- Slofstra SH, Groot AP, Obdeijn MH, Reitsma PH, ten Cate H, Spek CA. 2007. Gene expression profiling identifies C/EBPdelta as a candidate regulator of endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. *Am J Respir Crit Care Med*, 176 (6):602-609.
- Souza-Offtermatt G. et al. 2004. Intensivkurs Chirurgie. Erste Aufl. München: Urban & Fischer, 83.
- Speckmann E. 2008. Abwehr und Immunität. In: Hescheler J, Köhling R, Speckmann E, Hrsg. Physiologie. Fünfte Aufl. München: Urban & Fischer, 345-389.
- Stander S, Szepefalusi Z, Bohle B, Stander H, Kraft D, Luger TA, Metze D. 2001. Differential storage of hydroxyethyl starch (HES) in the skin: an immunoelectron-microscopical long-term study. *Cell Tissue Res*, 304 (2):261-269.
- Ständer S. et al. 2002. Hydroxyethyl starch does not cross the blood-brain or the placental barrier but the perineurium of peripheral nerves in infused animals. *Cell Tissue Res* 310:279-287.
- Stephens RC, Mythen MG. 2000. Saline-based fluids can cause a significant acidosis that may be clinically relevant. *Crit Care Med*, 28 (9):3375-3377.
- Stevens A, Lowe J. 1997. Histologie des Menschen. Zweite Aufl. Heidelberg: Chapman & Hall, 6.
- Su F, Wang Z, Cai Y, Rogiers P, Vincent JL. 2007. Fluid resuscitation in severe sepsis and septic shock: albumin, hydroxyethyl starch, gelatin or ringer's lactate-does it really make a difference? *Shock*, 27 (5):520-526.
- Sumpelmann R, Kretz FJ, Gabler R, Luntzer R, Baroncini S, Osterkorn D, Haeger MC, Osthaus WA. 2008. Hydroxyethyl starch 130/0.42/6:1 for perioperative plasma volume replacement in children: preliminary results of a European Prospective Multicenter Observational Postauthorization Safety Study (PASS). *Paediatr Anaesth*, 18 (10):929-933.
- Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P. 2003. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int*, 63 (5):1714-1724.
- Suttner S, Boldt J. 2004. Volume replacement with hydroxyethyl starch: is there an influence on kidney function? *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 39 (2):71-77.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. 2000. Control selection for RNA quantitation. *Bio-techniques*, 29 (2):332-337.
- Taber SS, Pasko DA. 2008. The epidemiology of drug-induced disorders: the kidney. *Expert Opin Drug Saf*, 7 (6):679-690.
- Taneja R. 1999. Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with reduced Caspase-3 activity. *Crit Care* 3(suppl 1):P97.
- Taneja R, Parodo J, Jia SH, Kapus A, Rotstein OD, Marshall JC. 2004. Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. *Crit Care Med*, 32 (7):1460-1469.
- ten Cate H, Timmerman JJ, Levi M. 1999. The pathophysiology of disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*, 82 (2):713-717.
- Tennenberg SD, Solomkin JS. 1990. Activation of neutrophils by cachectin/tumor necrosis factor: priming of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced oxidative responsiveness via receptor mobilization without degranulation. *J Leukoc Biol*, 47 (3):217-223.
- Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. 1996. Acute renal failure. *N Engl J Med*, 334 (22):1448-1460.
- Thangaraju M, Rudelius M, Bieri B, Raffeld M, Sharan S, Hennighausen L, Huang AM, Sterneck E. 2005. C/EBPdelta is a crucial regulator of pro-apoptotic gene expression during mammary gland involution. *Development*, 132 (21):4675-4685.
- Theisen A. et al. 2002. Weber C, Asskali F, Förster H. Tissue storage of hydroxyethyl starch (HES) in an experimental repeated infusion study in rats. *Eur J Anaesth*, 29 Suppl. (24):A-638.

- Thomas C. 2006. Histopathologie: Lehrbuch und Atlas zur Befunderhebung und Differenzialdiagnostik. 14 Aufl. Stuttgart: Schattauer Verlag, 190-206.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281 (5381):1312-1316.
- Tiwari SC, Vikrant 2000. Review Article: Sepsis and the Kidney. *Journal of Indian Academy of Clinical Medicine* 5(1):44-54.
- Tjardes T, Neugebauer E. 2002. Sepsis research in the next millennium: concentrate on the software rather than the hardware. *Shock*, 17 (1):1-8.
- Tomic V, Russwurm S, Moller E, Claus RA, Blaess M, Brunkhorst F, Bruegel M, Bode K, Bloos F, Wippermann J, Wahlers T, Digner HP, Thiery J, Reinhart K, Bauer M. 2005. Transcriptomic and proteomic patterns of systemic inflammation in on-pump and off-pump coronary artery bypass grafting. *Circulation*, 112 (19):2912-2920.
- Treib J, Haass A. 1997. Rheologische Eigenschaften von Hydroxyethylstärke. *Dtsch Med Wochenschr*, 122:1319-1322.
- Turnbull RG, Talbot JA, Hamilton SM. 1995. Hemodynamic changes and gut barrier function in sequential hemorrhagic and endotoxic shock. *J Trauma*, 38 (5):705-712.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7):34.
- Vogt N, Brinkmann A, Georgieff M. 1998. The effect of HES, dextran and gelatin on kidney function. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 33 (4):268-270.
- Wagner C, Bernschneider T, Deneffle B. 2004. Reduzierte Chemotaxis der lokal aktivierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN): Ursache der Bakterienpersistenz bei der posttraumatischen Osteitis? [Meeting Abstract DGU]. Berlin.
- Wagner JG, Roth RA. 1999. Neutrophil migration during endotoxemia. *J Leukoc Biol*, 66 (1):10-24.
- Walker RA. 1989. The use of lectins in histopathology. *Pathol Res Pract*, 185 (6):826-835.
- Wang L, Rayanade RJ, Garcia D, Patel K, Pan H, Sehgal PB. 1995. Modulation of interleukin-6-induced plasma protein secretion in hepatoma cells by p53 species. *J Biol Chem*, 270 (39):23159-23165.
- Waters JH, Gottlieb A, Schoenwald P, Popovich MJ, Sprung J, Nelson DR. 2001. Normal saline versus lactated Ringer's solution for intraoperative fluid management in patients undergoing abdominal aortic aneurysm repair: an outcome study. *Anesth Analg*, 93 (4):817-822.
- Webb AR, Tighe D, Moss RF, al-Saady N, Hynd JW, Bennett ED: Advantages of a narrow-range, medium molecular weight hydroxyethyl starch for volume maintenance in a porcine model of fecal peritonitis. *Crit Care Med* 1991; 19: 409-416.
- Weber S. et al. 2004. Apoptose als Pathomechanismus in der Sepsis. *Der Anaesthetist*, 53 (1):59-65(57).
- Webster NJ, Resnik JL, Reichart DB, Strauss B, Haas M, Seely BL. 1996. Repression of the insulin receptor promoter by the tumor suppressor gene product p53: a possible mechanism for receptor overexpression in breast cancer. *Cancer Res*, 56 (12):2781-2788.
- Wedel A, Ziegler-Heitbrock HW. 1995. Immunobiology. 193:171-185.
- Wei HX, Yang Y, Qiu HB, Guo T, Zhao MM, Chen QH. 2009. Effects of the treatment with different fluids on alveolar epithelium barrier in rats with acute lung injury. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 21 (7):412-415.
- Weiss G, Steffanie W, Lippert H. 2007. Peritonitis: main reason of severe sepsis in surgical intensive care. *Zentralbl Chir*, 132 (2):130-137.
- Weiss SJ. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, 320 (6):365-376.

- Wernersson R, Schierup MH, Jorgensen FG, Gorodkin J, Panitz F, Staerfeldt HH, Christensen OF, Mailund T, Hornshøj H, Klein A, Wang J, Liu B, Hu S, Dong W, Li W, Wong GK, Yu J, Wang J, Bendixen C, Fredholm M, Brunak S, Yang H, Bolund L. 2005. Pigs in sequence space: a 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing. *BMC Genomics*, 6 (1):70.
- Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayala A. 2007. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets*, 8 (4):493-500.
- Weyman AE. 2002. Exploring the relationship between hyperlipidemia and aortic stenosis. *Rev Cardiovasc Med*, 3 (3):160-161.
- Wiedermann CJ. 2009. Kidney damage by hydroxyethyl starch of lower molecular weight and substitution. *Eur J Anaesthesiol*, 26 (1):83-84.
- Winkelmayer WC, Glynn RJ, Levin R, Avorn J. 2003. Hydroxyethyl starch and change in renal function in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Kidney Int*, 64 (3):1046-1049.
- Wittlinger M. et al. 2008. Effect of different HES preparations (HES 130/0.42; HES 200/0.5) on activated proximal tubular epithelial cells *in vitro*. *Eur J Anaesthesiol* 25 (Suppl 44):173.
- Wittmann P, Sinowatz F. 1989. Cellular specificity of lectin binding in the kidney of the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Anat Histol Embryol*, 18 (2):122-135.
- Wu L, Tiwari MM, Messer KJ, Holthoff JH, Gokden N, Brock RW, Mayeux PR. 2007. Peritubular capillary dysfunction and renal tubular epithelial cell stress following lipopolysaccharide administration in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292 (1):F261-268.
- Yang QH, Liu DW, Long Y, Liu HZ, Chai WZ, Wang XT. 2009. Acute renal failure during sepsis: potential role of cell cycle regulation. *J Infect*, 58(6):459-64.
- Ysebaert DK, De Greef KE, Vercauteren SR, Ghielli M, Verpooten GA, Eyskens EJ, De Broe ME. 2000. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant*, 15 (10):1562-1574.
- Zander R, Boldt J, Engelmann L, Mertzluft F, Sirtl C, Stüttgen R. 2007. The design of the VISEP trial. Critical appraisal. *Anaesthesist*, 56 (1):71-77.
- Zanotti S, Kumar A, Kumar A. 2002. Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert Opin Investig Drugs*, 11 (8):1061-1075.
- Zdziarski P, Simon K. 2001. Sepsis - continual pathogenetic, diagnostic and therapeutic problem. *Pol Merkur Lekarski*, 11 (64):362-369.
- Zeni F, Freeman B, Natanson C. 1997. Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Crit Care Med*, 25 (7):1095-1100.
- Zervos EE, Norman JG, Denham DW, Carey LC, Livingston D, Rosemurgy AS. 1997. Cytokine activation through sublethal hemorrhage is protective against early lethal endotoxic challenge. *Arch Surg*, 132 (11):1216-1220; discussion 1220-1211.
- Zervos EE, Kramer AA, Salhab KF, Norman JG, Carey LC, Rosemurgy AS. 1999. Sublethal hemorrhage blunts the inflammatory cytokine response to endotoxin in a rat model. *J Trauma*, 46 (1):145-149.
- Zhai H, Yao Y, Lu L. 1999. The relationship between tissue tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) mRNA expression and gut-derived endotoxemia in rats after thermal injury. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi*, 15 (6):424-427.
- Zhang Y, Ren YB, Jiang L. 2006. Changes in renal cell apoptosis and inflammatory cytokines in early stage of sepsis in rats. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 18 (2):89-91.
- Zhu C, Wang X, Hagberg H, Blomgren K. 2000. Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurochem*, 75 (2):819-829.

8 ANHANG

8.1 Immunhistologisch verwendete Lösungen und Reagenzien

Phosphatgepufferte NaCl-Lösungen für die Immunhistochemie	
Stammlösung 10x PBS	58 g Dinatriumhydrogenphosphat, 4 g Kaliumchlorid, 160 g Natriumchlorid, 4 g Kaliumhydrogenphosphat in 1800 ml Aqua dest. gelöst, mit HCl oder NaOH pH-Wert auf 7,4 eingestellt und auf 2000 ml Aqua dest. aufgefüllt
Arbeitslösung 1x PBS	10:1 Verdünnung mit Aqua dest.
4% Paraformaldehyd (pH 7,0) in PBS zur Gewebefixierung	
80 g Paraformaldehyd mittels Wägeschalen abgemessen und in 1500 ml Aqua dest. aufgelöst, Zufuhr von 200 ml 10x PBS, 2 h in einem 70 °C warmen Wasserbad zur Lösung der Aggregate, nach Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur Einstellung des pH-Wertes (7,0) und Volumen-Justierung auf 2000 ml	
Citrat-Puffer (pH 6,0) für die hitzeinduzierte Antigendemaskierung	
Stammlösung 10x Citrat-Puffer	21 g Trinatrium-Citrat (Sigma, St.Louis, USA) in 800 ml Aqua dest. gelöst, mit NaOH auf pH-Wert 6,0 eingestellt, ad 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt
Arbeitslösung 1x Citrat-Puffer	10:1 Verdünnung mit Aqua dest.
Tris-Puffer (pH 7,4) für Antigenmaskierung	
Stammlösung 10x Tris-Puffer	0,15 mol/l NaCl (87,66 g); 0,05 mol/l Tris HCl (78,80 g); auf 800 ml auffüllen, und mit NaOH auf pH-Wert 7,4 eingestellt, 0,05% Tween 20 (5 ml) zugeben (Sigma, St.Louis, USA), auf 1000 ml auffüllen
Arbeitslösung 1x Tris-Puffer	10:1 Verdünnung mit Aqua dest.

HE-Färbung

Hämatoxylin nach P.Mayer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D)
 Eosin (Certistain®, Merck, Darmstadt, D)
 Xylol (J.T.Baker, Deventer, Holland)
 Ethanol (J.T.Baker, Deventer, Holland)
 Aquadek (Merck, Darmstadt, D)

Esterase-Färbung

Leucognost® NASDCL (Merck, Darmstadt, D) Reagenz 1 Tris-Puffer-Konzentrat
 Reagenz 2 Naphthol AS-D Chlorazetat
 Reagenz 3 Natriumnitrat-Lösung
 Reagenz 4 Fast Red violett LB Salz-
 Lösung

Lösung A: 10 ml Reagenz 1 mit 60 ml Aqua dest. verdünnen, eine Flasche Reagenz 2 dazugeben, das Glas 2-3x mit einigen ml Puffer nachspülen

Lösung B: 15 Tropfen Reagenz 3 zu einer Flasche Reagenz 4 geben, mischen und 2 min inkubieren lassen

Lösung C: Lösung B zu Lösung A geben, das Glas 2-3x mit einigen ml Lösung des Substrat-Puffergemisches nachspülen

Aquatek (Merck, Darmstadt, D)

TUNEL-Färbung

3% H₂O₂ (Sigma, St.Louis, USA)

TdT Enzym und Reaktions-Puffer (APOPTAG®, Q-BIOgene, Heidelberg, D)

Parafilm® (American National Can™, Greenwich, USA)

10% Donkeyserum (Fa. Rockland, Gilbertsville, USA)

Arbeitslösung 1% Donkeyserum 980 µl: Aqua.dest, 10 µl Donkeyserum, 10 µl 10x PBS
 Anti-Digoxigenin-POD (Fab fragments, Roche, Mannheim, D), im Verhältnis 1:300 mit Aqua dest. verdünnen

DAB Mischung: 1 Tropfen Chromogen auf 1 ml DAB Substrat (Dako Cytomation, D)

Entellan (Merck, Darmstadt, D)

Jones-Färbung

Silber-Methenamin-Lösung
 nach Gomori

20 ml 3% Hexamin, 1 ml 5% Silbernitrat (Riedel de Haen, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, D) wird zuerst trüb, schwenken bis wieder klar, 2 ml 5% Natriumtetraborat (Borax) zugeben, 25 ml Aqua dest.

Perjodsäure (Merck, Darmstadt, D)

Goldchlorid-Lösung (Sigma-Aldrich GmbH, München, D)

Lektin-Färbung

- (A) Trypsin: 0,1 g Trypsin in 100 ml vorgewärmtem Aqua dest. lösen, 0,1 g Calciumchlorid zugeben und pH auf 7,8 einstellen mit NaOH
- (B) Preblock (Zytomed Systems GmbH, Berlin, D)
- (C) Avidin/Biotin Blocking-Kit (Vector laboratories, Peterborough, E)
Avidin Raumtemperatur 15 min, 3x TBS, Biotin Raumtemperatur 15 min
- (D) biotinylierter Antikörper (*Phaseolus vulgaris* Erythroagglutinin, Vector laboratories, Peterborough, GB): Verdünnung 1:6000 in Antibody-diluent
- (E) Streptavidin Peroxidase Konjugat (biomed) 1:1600 verdünnt in Antibody-diluent (Zytomed Systems GmbH, Berlin, D)
- (F) SG-Kit (Vector laboratories, Peterborough, E)

MSB-Färbung

- | | |
|--|---|
| (A) Weigert`s Ironhämatoxylin | (1) vier Wochen vor der Verwendung 1 g, Hämatoxylin in 100 ml 95% EtOH lösen, (2) 2 ml 60% wässrige Eisen-III-Chlorid-Lösung in 97 ml Aqua dest. lösen und 1 ml HCl dazugeben |
| Arbeitslösung | Mix aus (1) und (2) vermischen bis es eine violett-schwarze Farbe erreicht |
| (B) Martius Yellow Solution | 5 ml 40% Phosphorwolframsäure (Merck, Darmstadt, D), 95 ml 0,5% Martius yellow (Waldeck GmbH & Co, Division Chroma, Münster, D) |
| (C) 75 ml 1% Kristallponceau in 2.5 % Essigsäure (Waldeck, Münster, D) | |
| (D) 0,5% Anilinblau (Waldeck, Münster, D) in 1% Essigsäure (Merck, Darmstadt, D) | |

PAS-Färbung

PAS-Färbesystem (Sigma-Aldrich GmbH, München, D)

8.2 Datenanhang

Tab. 3 **Volumenmenge pro Versuchstier und -gruppe**

<i>Versuchstier pro Gruppe</i>	<i>Sham</i>	<i>Sepsis + HES 130</i>	<i>Sepsis + HES 200</i>	<i>Sepsis + Gelatine</i>	<i>Sepsis + Ringer-Azetat</i>
Erstes	2250	6200	2600	4000	7450
Zweites	3700	4900	2600	7000	8100
Drittes	3700	4800	4300	4300	18400
Viertes	-	7800	4500	3800	20600
Fünftes	-	5350	4400	5400	25150
Ø	3217	5810	3680	4900	15940

Ø = durchschnittliche Volumenmenge (in ml)

Tab. 4 **Auflistung der einzelnen Versuchstiere**

Bezeichnung des Versuchstieres	Volumenersatzlösung
Sy 40	Ringer-Azetat
Sy 41	Ringer-Azetat
Sy 42	6% HES 130
Sy 43	6% HES 130
Sy 44	10% HES 200
Sy 45	4% Gelatine
Sy 46	4% Gelatine
Sy 47	Ringer-Azetat
Sy 48	10% HES 200
Sy 49	Ringer-Azetat
Sy 50	10% HES 200
Sy 51	4% Gelatine
Sy 52	6% HES 130
Sy 54	10% HES 200
Sy 55	Sham
Sy 56	6% HES 130
Sy 57	4% Gelatine
Sy 58	Ringer-Azetat
Sy 59	Sham
Sy 60	4% Gelatine
Sy 61	Sham
Sy 62	6% HES 130
Sy 63	10% HES 200

Sy 53, 4% Gelatine ist frühzeitig verstorben, außer Wertung

Tab. 9 Anzahl der Esterase-positiven Zellen in den verschiedenen Kompartimenten

	Glomeruli	Gesamt-Niere	Tubuli-interstitiell
Asymptotische Signifikanz	0,043	0,037	0,013

Kruskal-Wallis-Test; $p \leq 0,05$

Tab. 10 Anzahl Esterase positiver Zellen in Glomeruli

Glomeruli	Sham	Sepsis + HES 130	Sepsis + HES 200	Sepsis + Gelatine	Sepsis + Ringer-Azetat
Sham					
Sepsis + HES 130	0,089				
Sepsis + HES 200	0,036	0,151			
Sepsis + Gelatine	0,143	1	0,222		
Sepsis + Ringer	0,143	0,548	0,016	0,548	

Mann-Whitney-*U*-Test; Exakte Signifikanz (2-seitig) $p \leq 0,05$

Tab. 11 Anzahl Esterase positiver Zellen Tubuli-interstitiell

Tubuli-interstitiell	Sham	Sepsis + HES 130	Sepsis + HES 200	Sepsis + Gelatine	Sepsis + Ringer-Azetat
Sham					
Sepsis + HES 130	0,036				
Sepsis + HES 200	0,036	0,222			
Sepsis + Gelatine	0,107	0,11	0,016		
Sepsis + Ringer	0,786	0,222	0,016	0,841	

Mann-Whitney-*U*-Test; Exakte Signifikanz (2-seitig) $p \leq 0,05$

Tab. 13 Anzahl der TUNEL-positiven Zellen in den verschiedenen Kompartimenten

	Glomeruli	Gesamt-Niere	Tubuli-interstitiell
Asymptotische Signifikanz	0,058	0,033	0,033

Kruskal-Wallis-Test; $p \leq 0,05$

Tab. 14 **Anzahl TUNEL-positiver Zellen Tubuli-interstitiell**

Tubuli-interstitiell	Sham	Sepsis + HES 130	Sepsis + HES 200	Sepsis + Gelatine	Sepsis + Ringer-Azetat
Sham					
Sepsis + HES 130	0,393				
Sepsis + HES 200	0,036	0,056			
Sepsis + Gelatine	0,036	0,31	0,22		
Sepsis + Ringer	0,393	1	0,056	0,151	

Mann-Whitney-*U*-Test; Exakte Signifikanz (2-seitig) $p \leq 0,05$ Tab. 15 **Anzahl PHA-E-positiver Signale im gesamten Nierengewebe**

Tubuli-interstitiell	Sham	Sepsis + HES 130	Sepsis + HES 200	Sepsis + Gelatine	Sepsis + Ringer-Azetat
Sham					
Sepsis + HES 130	0,082				
Sepsis + HES 200	0,032	0,177			
Sepsis + Gelatine	0,095	0,662	0,310		
Sepsis + Ringer	0,151	0,792	0,151	0,310	

Mann-Whitney-*U*-Test; Exakte Signifikanz (2-seitig) $p \leq 0,05$ Tab. 17 **Expression verschiedener proinflammatorischer und apoptotischer Gene**

Gruppen	<i>n</i>	<i>P53</i>	<i>IL6</i>	<i>TNFα</i>	<i>CASP3</i>	<i>C/EBP-β</i>
Sham	6	0.00 \pm 0,06	0.00 \pm 0,22	0.00 \pm 0,18	0,00 \pm 1,27	0.00 \pm 0,05
Sepsis + HES 130	10	-0,04 \pm 0,18	-0,33 \pm 0,40	-0,57 \pm 0,26	-1,90 \pm 1,65	-0,31 \pm 0,97
Sepsis + HES 200	10	-0,10 \pm 0,20	-0,84 \pm 0,89	-0,25 \pm 0,38	0,16 \pm 0,45	-0,20 \pm 0,46
Sepsis + Gelatine	10	2,06 \pm 0,25	2,03 \pm 0,40	2,02 \pm 0,22	1,55 \pm 0,62	3,27 \pm 1,92
Sepsis + Ringer-Azetat	8	3,12 \pm 0,13	3,16 \pm 0,21	2,59 \pm 0,18	2,34 \pm 1,03	2,96 \pm 0,17

Dargestellt sind Mittelwerte (log2) \pm Standardfehler des Mittelwertes (STABW) der Genexpression (Ratio von Gen/Kontrolle, *n*=Anzahl der Nieren) mit jeweiliger Normierung auf das Referenzgen *β -ACTB*

9 CURRICULUM VITAE

<p>Name Geboren am: Familienstand: Wohnhaft in:</p>	<p>Persönliche Daten Sylvia Krause 31. Januar 1983 in Jena ledig 07747 Jena, Binswangerstraße 8</p>
<p>09/1989 08/1993 10/2002 09/2005 05/2006</p>	<p>Ausbildung 9.Grundschule, Jena „GutsMuths“ Sportgymnasium, Jena Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität (FSU), Jena Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung experimentelle Promotion im Bereich Sepsisforschung (Betreuer: Univ. Prof. Dr. med. G. Marx, Leitender OA der Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie an der FSU Jena, seit 11/2009 Klinikdirektor und Lehrstuhlinhaber für operative Intensivtherapie am Universitätsklinikum Aachen)</p>
<p>07/2002 08/2003 08/2006-10/2006 08/2007 09/2008 02/2009 07/2009 10/2009</p>	<p>Praktika Krankenpflegepraktikum, Abt. Pneumologie, FSU, Jena Krankenpflegepraktikum, Abt. Pädiatrie, FSU, Jena Famulatur, Abt. Intensivstation, FSU, Jena Famulatur, Abt. Gastroenterologie, AKH, Wien (A) Famulatur, Orthopädische Praxis, Jena PJ-Tertial, Abt. Unfallchirurgie, HELIOS-Klinikum, Erfurt PJ-Tertial, Innere Medizin, Kantonspital, Luzern (CH) PJ-Tertial, Neurologie, FSU, Jena</p>
<p>05/2007-05/2008 01/2008-01/2009 05/2008-01/2009</p>	<p>Berufliche Tätigkeiten studentische Hilfskraft, Abt. Intensivstation, FSU Jena wissenschaftliche Hilfskraft, Abt. Herz-und Thoraxchirurgie, FSU Jena zusätzlich wissenschaftliche Hilfskraft, Abt. Neurologie/ Schlaflabor, FSU Jena</p>
<p>06/2009</p>	<p>Poster und Veröffentlichungen Sossdorf M, Bockmeyer CL, Kentouche K, Reuken P, <u>Krause S</u>, Krusche C, Marx G, Loesche W, Becker J, Claus RA: (2009) Renal thrombotic microangiopathy with severe necrosis in a septic porcine 2-hit model. 22nd Congress International Society on Thrombosis and Haemostasis, Boston; J Thrombosis Haemostasis 7 (Suppl.2) 962</p>

09/2009	<p>Bockmeyer CL, Reuken PA, Sossdorf M, <u>Krause S</u>, Becker J, Lösche W, Marx G, Claus RA: (2009) Renal thrombotic microangiopathy with severe arterial necrosis in a septic porcine 2-hit model. 4th Congress Sepsis and Multiple Organ Failure, Weimar; Infection 37 (Suppl. 3) 20</p>
1992-2003	<p>Interessen Leistungssport Leichtathletik, Juniorenweltmeisterschaftsteilnahme 2002 Jamaika (Disziplin 100m Hürden)</p>

10 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Gernot Marx, der die initiale Idee für dieses Projekt hatte, sowie dessen exzellente Betreuung im Rahmen meiner Promotion.

Herrn PD Dr. rer. nat. med. habil. Ralf Claus, als kommissarischer Leiter des Forschungslabors der Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie, Jena, danke ich für die freundliche Unterstützung während meiner experimentellen Tätigkeit sowie insbesondere bei der Anfertigung der Dissertation.

In Kooperation mit der medizinischen Hochschule Hannover, möchte ich weiterhin Dr. med. Clemens Bockmeyer, Abteilung für Pathologie, für die äußerst hilfreichen Ratschläge bezüglich Anfertigung mikroskopischer Präparate und gegebenen Hilfestellungen bei allen Fragen zur Mikroskopiertechnik und Dr. med. Sascha David, Abteilung für Nephrologie, zur Datengestaltung bezüglich der Histologie danken.

Für die stets konstruktive Hilfeleistung allgemeiner labortechnischer Probleme sowie freundlicher Beratung bei der Vorbereitung und Durchführung experimenteller Versuche danke ich Herrn Dr. Tim Simon, Frau Barbara Schmidt und insbesondere Frau Brigitte Specht.

Für die hilfsbereite Lösung von theoretischen und experimentellen sowie statistischen Problemen im Rahmen der molekularbiologischen Datenerhebung und Datenanalyse gilt ein weiterer Dank Dipl.-Sportwissenschaftler Maik Sossdorf, Dr. med. Martina Weber, cand. med. Michael Steiner und Dipl.-Biologe Peter Recknagel für die freundliche Unterstützung bei allen generellen wissenschaftlichen Fragestellungen.

Dr. med. M. Specht, Dipl.-Informatiker Michael Schröck und Graphikdesigner Christian Kapke danke ich für die freundliche Hilfe bei speziellen Fragestellungen zur Computer-Software.

Zudem möchte ich insbesondere meinem Partner, meiner Familie und meinen Freunden für die grenzenlose und uneingeschränkte Unterstützung danken.

11 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. G. Marx, PD Dr. rer. nat. med. habil. R. Claus, Dr. med. Clemens Bockmeyer, Herr M. Sossdorf, Herr P. Recknagel und Frau B. Specht,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 05.05.2010